Aus der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer
der Kinderklinik der Universität Tübingen

# Die antiproliferative Wirkung von Interferon und zytostatischen Substanzen auf menschliche Tumorzellen in vitro anhand der Monolayer Methode

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
MANFRED DILGER
aus Mahlstetten

1985

Aus der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer
der Kinderklinik der Universität Tübingen

# Die antiproliferative Wirkung von Interferon und zytostatischen Substanzen auf menschliche Tumorzellen in vitro anhand der Monolayer Methode

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
MANFRED DILGER
aus Mahlstetten

1985

| | |
|---|---|
| Dekan: | Professor Dr. H. D. Waller |
| 1. Berichterstatter: | Privatdozent Dr. J. Treuner |
| 2. Berichterstatter: | Privatdozent Dr. J. Saal |

---

*gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen*

Meinen Eltern und

meiner Frau gewidmet

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. | Einleitung | 1 |
| II. | Materialien und Methode | 8 |
| 2.1. | Materialien und Geräte | 8 |
| 2.1.1. | Zellinien | 8 |
| 2.1.2. | Zytostatika | 8 |
| 2.1.3. | Interferone und damit zusammenhängende Substanzen | 11 |
| 2.1.3.1. | Interferone | 11 |
| 2.1.3.2. | Mock - Interferone und Inducer von IFN - $\gamma$ | 11 |
| 2.1.4. | Materialien für den Umgang mit Zellkulturen | 12 |
| 2.2. | Methoden | 13 |
| 2.2.1. | Kultivierung der Zellinien | 13 |
| 2.2.2.1. | Monolayer Methode | 13 |
| 2.2.2.2. | Darstellung der in der Parallelarbeit von J. Buck benützten Semi-Soliden-Agarmethode | 14 |
| 2.2.3. | Interferonansatz | 16 |
| 2.2.4. | Zytostatikaansatz | 16 |
| 2.2.5. | Statistik | 17 |
| 2.2.5.1. | Allgemeine Statistik | 17 |
| 2.2.5.2. | Statistik der Kombinationsversuche | 17 |
| 2.2.6. | Fehlerbetrachtung | 18 |
| 2.2.6.1. | Statistik | 18 |
| 2.2.6.2. | Wachstumsverhalten der Zellen | 18 |
| 2.2.6.3. | Umweltbedingungen | 19 |
| 2.2.6.4. | Interferon | 20 |
| 2.2.6.5. | Pipettierfehler | 20 |
| 2.2.6.6. | Messfehler | 20 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| III. | Ergebnisse | 21 |
| 3.1. | Ergebnisse der Wachstumskurven | 21 |
| 3.2. | Vergleich der Zellinien in ihrer Empfindlichkeit gegenüber der Dauerexposition mit IFN - ß | 23 |
| 3.2.1. | Monolayer Methode | 23 |
| 3.2.2. | Agar Methode | 24 |
| 3.2.3. | Vergleich der Methoden | 26 |
| 3.2.4. | Verlaufskurven der Zellinien über 3 Wochen mit der Monolayer Methode | 27 |
| 3.3. | Wachstumshemmende Wirkung der Mock - Präparation | 30 |
| 3.4. | Vergleich des antiproliferativen Effekts verschiedener alpha und beta IFNe | 34 |
| 3.5. | Vergleich der wachstumshemmenden Wirkung von IFN - ß und IFN - δ | 37 |
| 3.6. | Zeitbegrenzte Interferon-Exposition | 40 |
| 3.6.1. | Ergebnisse nach einmaliger IFN - Exposition | 40 |
| 3.6.2. | Ergebnisse nach mehrmaliger Interferonexposition | 42 |
| 3.6.3. | Induktion der 2' - 5' Synthetase | 44 |
| 3.7. | Antiproliferativer Effekt verschiedener Zytostatika | 46 |
| 3.8. | Ergebnisse der Kombinationsversuche | 54 |
| 3.8.1. | Ergebnisse nach 24 h Zytostatikaexposition | 55 |
| 3.8.2. | Ergebnisse nach 1 h Zytostatikaexposition | 57 |
| 3.8.3. | Darstellung der einzelnen Wochenergebnisse | 64 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| IV. | Diskussion | 70 |
| 4.1. | Vergleich: in vitro - in vivo | 71 |
| 4.2. | Methodenvergleich | 73 |
| 4.3. | Antiproliferativer Effekt des IFN | 77 |
| 4.4. | Wachstumshemmende Wirkung des Mock | 79 |
| 4.5. | Wirkungsvergleich der alpha, beta und gamma Interferone | 82 |
| 4.6. | Die Ausbildung der antiproliferativen Wirkung des Interferons in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit | 85 |
| 4.7. | Expositionsversuche mit Zytostatika | 87 |
| 4.8. | Diskussion der Kombinationsergebnisse | 94 |
| V. | Zusammenfassung | 107 |
| VI. | Literaturverzeichnis | 109 |

## I. Einleitung

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich die Wirkung von Interferon in Kombination mit zytostatischen Substanzen auf menschliche Tumorzellen untersucht.

Interferon wurde erstmals 1956 von ISAACS und LINDEMANN als antiviral wirksame Substanz beschrieben (62).

Nachdem Interferon in den Jahren nach seiner Entdeckung aus verschiedenen Gründen wenig Beachtung fand, erlebte die Interferonforschung in den letzten 10 Jahren eine Zeit umfangreicher Auseinandersetzungen.

Über Interferone ist bekannt, daß sie eine Gruppe von induzierbaren Glykoproteinen sind, die auf bestimmte Reize hin von eukaryonten Zellen abgegeben werden und die Fähigkeit haben, die Virusreplikation zu hemmen. Solche Reize für die Zelle sind RNS - oder DNS - Viren, synthetische Polynukleotide, Bakterien, mitogene Substanzen oder andere Stoffe. Sowohl Reizsubstanz als auch Zellart bestimmen die Unterschiedlichkeit der Interferone (109).

Für das humane System sind folgende Interferone bekannt: (97)

1) Leukozyteninterferon IFN - $\alpha$ : Wahrscheinlich 12 Arten
2) Fibroplasteninterferon IFN - $\beta$ : Wahrscheinlich 2 Arten
3) Immuninterferon IFN - $\gamma$

Neben der antiviralen Eigenschaft (95) werden den Interferonen noch andere Aktivitäten zugeschrieben; diese seien tabellarisch genannt:

1. Das Immunsystem betreffende Wirkungen

   a) Depression des B - Zellsystems (42)
   b) Stimulation der Phagozytose (89)
   c) Stimulation der Zytotoxität von T - und NK - Zellen (72, 90)

2. Antiproliferative Wirkung

   a) Änderung der Membranstruktur (83)
   b) Stimulation der Zelldifferenzierung (109)
   c) Inhibition der Zellmultiplikation (81)

Die antiproliferative Wirkung der Interferone ist eine zentrale Frage der Interferonforschung. Dies zeigt auch der folgende Rückblick über die wichtigsten Arbeiten auf diesem Gebiet.

PAUCKER, CANTELL und HENLE berichteten 1962 als erste, daß Interferon das Wachstum von Zellinien hemmt (81). COCITO und andere führten diesen Effekt auf "nicht Interferon" Verunreinigungen in ihren Interferonzubereitungen zurück, da sie ihn mit etwas gereinigterem Interferon nicht mehr messen konnten (25, 70).

Von vielen Untersuchern (2, 42, 44, 58, 64) wurde behauptet, daß der antiproliferative Effekt vom Interferonmolekül abhängt, während andere (11, 17, 59) entweder mit Interferon keine Hemmung messen konnten oder keine Beziehung im Verhältnis von einerseits antiviraler und andererseits antiproliferativer Aktivität beobachten konnten.

Der Beweis für eine dieser beiden Thesen hing einerseits von der Fähigkeit ab, die Hemmung genau messen zu können und für andere reproduzierbar zu machen. Andererseits von der Möglichkeit, Interferone von sehr hohem Reinheitsgrad herzustellen, um diese auf ihre zellwachstumshemmende Wirkung zu prüfen.

Die Bedingungen für die Reproduzierbarkeit wurden in den Arbeiten von LINDAHL - MAGNUSSON 1971 dargestellt (71).

GRESSER (49) und KNIGHT (64) haben 1973 mit hoch gereinigtem Interferon den Zusammenhang von antiviraler und antiproliferativer Aktivität nachgewiesen.
Trotzdem ist es möglich, daß ein Teil des antiproliferativen Effektes durch Fremdproteine verursacht wird. Man hat mit MOCKpräparaten* (36, 82) den antiproliferativen Effekt, der durch Verunreinigungen verursacht wird, von dem des Interferonmoleküls getrennt gemessen. In den wenigen bisher veröffentlichten Arbeiten wurde von einigen Untersuchern (36, 58, 60) bei MOCK - Konzentrationen, die $10^3$ I.U./ml Interferon entsprechen, eine Zellvermehrungshemmung beobachtet.* Jedoch scheint es auch hier Unterschiede zu geben, denn andere Untersucher (2, 38, 8) konnten diesen MOCKeffekt mit niedrigeren Konzentrationen oder anderen Präparaten nicht feststellen.

Zusammenfassend können als Nachweise für die antiproliferative Aktivität von Interferon folgende Untersuchungen angeführt werden:

a) Wenig und hochgereinigte Interferone, unabhängig von Zellquelle und induzierenden Substanzen, üben in konstantem Verhältnis einen relativ wirtsspezifischen antiviralen und antiproliferativen Effekt aus(49, 96).

b) Die antiproliferative Komponente erfüllt alle Interferonkriterien (75).

* MOCK: Präparat mit derselben Zusammensetzung wie das Interferonpräparat ohne das Interferonmolekül oder mit inaktiviertem Interferon.

c) Mäuse $L_{1210}$ - Zellen, die resistent sind gegen die antivirale Aktivität von Interferon (43) oder unfähig sind Interferon zu binden (50), sind auch resistent gegen die antiproliferative Aktivität von Interferonen (44). Umgekehrt gilt, daß für Chromosomen 21 trisomale menschliche Zellen, die antiviral empfindlicher mit Interferon reagieren (103), auch empfindlicher sind gegenüber seiner vermehrungshemmenden Wirkung (27). Wahrscheinlich können trisomale Zellen vermehrt Interferon binden (117).

d) Menschliche alpha und beta Interferone ergeben in der Elektrophorese mit SDS Poliacrylamidgel gleiche Banden für die antivirale und antiproliferative Aktivität(118).

e) Hochgereinigtes Mäuseinterferon, spez. Aktivität $10^9$ I.U./mg (51) und menschliches Interferon - ß, spez. Aktivität $2 \times 10^8$ I.U./mg (65), ist gleich wie ungereinigtes Interferon fähig, die Zellvermehrung zu hemmen.
Dies gelang auch mit dem Mäuseinterferoid* (95).

f) Wie oben angeführt, sind heute verschiedene Interferone bekannt. Von allen wird in der Literatur eine antiproliferative Aktivität berichtet (14), wobei IFN - $\alpha$ schwächer wirksam sein soll als IFN - ß.
Das jetzt zur Verfügung stehende IFN - $\gamma$ soll antiproliferativ stärker sein als IFN - $\alpha$ oder IFN - ß.
In vergleichenden Untersuchungen wurden die Interferone hinsichtlich der antiproliferativen Wirkung auf verschiedene Zellinien unter dieser Fragestellung **verglichen.** ( Siehe 3.4. und 3.5. )

* Interferon ist ein Glykoprotein.
Interferoid ist das Protein ohne den Kohlehydratanteil.

STRANDER begann 1972 mit den ersten Behandlungsversuchen mit Interferon bei Patienten mit osteogenem Sarkom. Die Ergebnisse nach einer 5-jährigen Beobachtungszeit der Studie vermittelt die Tabelle.

| Metastasierung nach Monat | Gruppe mit IFN - $\alpha$ | konkurrierende Kontrollgruppe | historische Kontrollgruppe |
|---|---|---|---|
| 6 | 16 % | 27 % | 57 % |
| 18 | 43 % | 60 % | 86 % |
| 60 | 54 % | 75 % | 86 % |

In der Interferongruppe befanden sich zu diesem Zeitpunkt 38 Patienten. Die mit Interferon behandelte Gruppe zeigt gegenüber der konkurrierenden Kontrollgruppe und der historischen Kontrollgruppe die besseren Ergebnisse.

Einen Überblick über die bisherigen Behandlungsversuche bei primär und sekundär metastasierenden Erkrankungen und deren Ergebnisse bietet die folgende Tabelle:

KR = komplette Remission
PR = partielle Remission
GZ = Gesamtzahl

| Interferon - $\alpha$ | KR | PR | GZ | |
|---|---|---|---|---|
| Myelom | 2 | 5 | 9 | MELSTED (102) |
| Non Hodgkin | 3 | 0 | 6 | MERIGAN (79) |
| Leukämien: | | | | |
| CML | 0 | 2 | 4 | GUTTERMANN (109) |
| ALL | 5 | 0 | 5 | HILL (61) High Dose |
| AML | 3 | 0 | 3 | HILL (61) High Dose |
| Mammakarzinom | 0 | 7 | 17 | GUTTERMANN (53) |
| | 0 | 11 | 26 | BORDEN (16) |
| Kolonkarzinom | 0 | 3 | 7 | GUTTERMANN (109) |
| Prostatakarzinom | 0 | 4 | 4 | GUTTERMANN (109) |
| Ovarialkarzinom | 0 | 4 | 7 | GUTTERMANN (109) |
| Interferon - ß | | | | |
| Nasophayngeal-karzinom | 1 | 2 | 5 | TREUNER (107) |

Durch die in vitro - Testung menschlicher Tumorzellen auf Interferon können Hinweise für die klinische Anwendung gefunden werden. Es ergaben sich Parallelen in der Empfindlichkeit von Tumoren gegen IFN in vitro und in vivo (100).

Nachdem man bis heute nur bei wenigen Tumorarten mit den zur Verfügung stehenden Interferonen größere Erfolge erzielen konnte, geht man jetzt in der Therapie dazu über, Interferone mit Zytostatika zu kombinieren.

In der Bundesrepublik laufen zur Zeit zwei randomisierte Behandlungsprotokolle mit Interferon in Kombination mit Zytostatika:

1) Die COSS 80 Studie bei Patienten mit osteogenem Sarkom: Sie besteht aus 4 Teilen. Alle Patienten werden gleich mit Methotrexat und Adriamycin behandelt.

   Gruppe A erhält zusätzlich Bleomycin, Cyclophosphamid und Actinomycin D,
   Gruppe A 1 ohne, Gruppe A 2 mit Interferon.

   Gruppe B erhält zusätzlich Cis - platinum,
   Gruppe B 1 ohne, Gruppe B 2 mit Interferon (116).

2) Die Neuroblastomstudie Stadium IV bei Kindern:
   Hier erhalten alle Patienten die Zytostatika Adriamycin, Cyclophosamid, Vincristin, DTIC und eine Gruppe mit, die andere ohne Interferon (108).

Für eine derartige Kombinationsbehandlung gibt es jedoch wenige in vitro Versuche (1, 19, 24, 52, 92).
Bei Kombinationstherapien stellt sich die Frage nach der Interferenz der kombinierten Medikamente, denn die Summe der Wirkungen kann von antagonistisch bis synergistisch reichen.
Forschungen, die in vitro Hinweise für eine erfolgversprechende Kombinationstherapie geben, können eine Hilfestellung sein für die klinische Anwendung.

Ein großer Teil dieser Arbeit war solchen Kombinationsversuchen von Interferon mit Zytostatika gewidmet (siehe 3.8.).

Wenig ist auch darüber bekannt, wie lange Interferon auf Zellen einwirken muß, um einen antiproliferativen Effekt auszulösen. In der Literatur gibt es hierzu sehr widersprüchliche Angaben (18, 45, 82). Es wurde versucht, diese Zeitspanne in vitro nach abgestufter Zeitexposition von Interferon auf Zellen durch den Grad der ausgelösten Zellvermehrungshemmung und den Anstieg der 2'- 5'- Synthetase zu bestimmen (siehe 3.6.).

Für die Versuche wurde die aus den Veröffentlichungen STRANDERS (101) bekannte Monolayer Methode benützt.

In einer gleichzeitig von J. Buck* ausgeführten Arbeit wurden dieselben Versuche mit der von SALMON und HAMBURGER (87) entwickelten SEMI - SOLIDE - Agarmethode gemacht. Die Ergebnisse sind hier zum Teil dargestellt. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, die Resultate zweier verschiedener Methoden vergleichend zu diskutieren und die beiden Methoden einander gegenüberzustellen.

# II. Materialien und Methode

## 2.1. Materialien und Geräte

### 2.1.1. Zellinien

| Zellinie | Originaltumor | etabliert von/zur Verfügung gestellt von |
|---|---|---|
| RD (ATCC CCL 136) | Rhabdomyosarkom embryonal | etabliert von Mc ALLISTER, Febr.68 (78) |
| SAOS - 2 | Osteosarkom | zur Verfügung gestellt von Dr.JØRGEN FOGH vom Sloan-Kettering Institute of Cancer Research (39) |
| IMR - 32 (ATCC CCL 127) | Neuroblastom | etabliert von W.W.NICHOLS J.LEE,S.DWIGHT,April 67 (112)am Sloan-Kettering Institute of Cancer Research |
| SK - N - FI | Neuroblastom | zur Verfügung gestellt von Dr.JØRGEN FOGH vom Sloan-Kettering Institute of Cancer Research |

### 2.1.2. Zytostatika

| "Generic name" | | Handelsname | Firma |
|---|---|---|---|
| Actinomycin D | (Act.D.) | LYOVAG® COSMEGEN® | MERCK |
| Adriamycin | (ADR) | ADRIBLASTIN® | MONTEDISON PHARMA |
| BCNU | (BCNU) | CARMUBRIS® | BRISTOL |
| Cis-platinum | (Cis-p) | PLATINEX® | BRISTOL |
| DTIC | (DTIC) | DTIC - DOME® | MILES LABORATORIES |
| Methotrexat | (MTX) | METHOTREXAT "Lederle"® | LEDERLE |
| Vincristin | (VCR = Vin) | VINCRISTIN LILLY® | LILLY |
| VP - 16 | (VP - 16) | VEPESID® | BRISTOL |

| " Generic name" | Klasse chem. Bezeichnung (32) | P.C. µg/ml (7) | CXT µgh/ml (7) | Plasmahalbwertszeit (7) | zytostatische Wirkungsweise (31) |
|---|---|---|---|---|---|
| Actinomycin D (Dactinomycin)<br><br>in COSS 80 | Antibiotikum aus Streptomyces v. parvullus | 0,075 | 0,128 | $t_{1/2}$ term. = 28 - 38 h | Bindung zwischen oder an Purin-Pyrimidin-Basen-Paar der DNA. Verhinderung der DNA-abhängigen RNA-Synthese |
| Adriamycin (Doxorubicin)<br>in COSS 80<br>in CWS 81<br>in Neuroblastom | Antibiotikum aus Streptomyces var cassius; Antrazyklin | 0,5 | 1,38 | $t_{1/2}$ initial =30 min dann über Tage konstant | schiebt sich zwischen korrespondierendes Basenpaar der DNA. Verhinderung der DNA-vermittelten RNA- und DNA-Transkription. |
| BCNU (Carmustine) | Nitroharnstoff 1,3 bis chloro ( 2-chloroethyl ) 1 - nitrourea | 1,97 | 1,02 | 15-30 min | intrazellulär entstehende Metaboliten alkylieren DNA und interferieren mit DNA betreffenden Enzymreaktionen, Hemmung der DNA Synthese und DNA Reperatur |
| Cis-platinum<br>in COSS 80<br>in CWS 81 | Cis-diamine-dichloroplatinum II | 2,5 | 1,94 | $t_{1/2}$ initial = 25-79 min | Inhibitor von DNA-Precursoren Verhinderung der DNA Ablesung Verliert intrazellulär seine beiden Chloridanionen, wirkt dann alkylierend |
| DTIC (Dacarbazine)<br><br>in CWS 81 | 5-( 3,3 dimethyl-1-triazeno) imidazole-4-carboxamid | 15 | 3o,72 | $t_{1/2}$ initial =30 min | Alkylierend über Carboniumion Interaktion mit Sulfhydryl ( SH- ) Gruppen in Proteinen |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Methotrexat (MTX)<br><br>in COSS 80 | Antimetabolit | $10^{-4}$ mol* | | Bei Kindern und Hochdosistherapie<br>$t_{1/2\ initial}$ = 1,2 h<br>$t_{1/2\ terminal}$ = 10,2 h | Bindung an Dihydrofolat-Reduktase. Dadurch Blockierung der Reduktion der Dihydrofolsäure und Hemmung der DNA, RNA und Proteinsynthese<br><br>S-Phasen spezifisch |
| Vincristin<br><br>in CWS 81<br><br>in Neuroblastomstudie | Alkaloid aus Vinca rosea | 0,3 | 0,47 | $t_{1/2\ initial}$ = 20 min<br>$t_{1/2\ term.}$ = 190 min | Reversible Bindung an Mikrotubuli und Spindelproteine in S-Phase Verhinderung der Mitose. Unterbrechung der RNA und DNA Synthese durch Wirkung auf DNA vermittelte RNA Polymerase<br>S-Phasen spezifisch |
| VP 16 (Etoposid) | halbsynthetisches Podophylotoxin aus Podophyllum amodi | 30 | 91 | $t_{1/2\ term.}$ = 3-15 h | Hemmung des Zellzyklus während Metaphase der Mitose. Keine Bindung an Proteine der Mikrotubuli. Zellyse bei Mitoseeintritt, ab 10 µg/ml DNA u. RNA Synthesehemmung |

Tab.* Mitteilung von Dr. H. Diddens, Kinderklinik Tübingen

2.1.3. Interferone und damit zusammenhängende Substanzen

2.1.3.1. Interferone

| Interferonart | Ursprung | spez. Aktivität | zur Verfügung gestellt von |
|---|---|---|---|
| IFN -$\alpha$ | humane Leukozyten | 1 x $10^6$IU/ml | Dr.H.CANTELL Helsinki(21) |
| IFN -$\alpha$ | humane Lymphoblasten (Namalva) | 1 x $10^6$IU/mg | A.MIZRAHI,Ph.D. Departement of Biotechnology Ness Ziona, Israel(9/91) |
| IFN -$\alpha_2$ | E.coli | 1,5x$10^6$IU/ml | M.FOUNTOULAKIS Universität Zürich(80) |
| IFN - ß | humane Fibroblasten | 2,3x$10^6$IU/mg | Fa.RENTSCHLER Laupheim(110) |
| IFN - ß | humane Fibroblasten | 2 x $10^8$IU/mg | E.KNIGHT(67) |
| | | 2,5x$10^3$IU/ml | Wilmington,USA |
| IFN -$\gamma$ | | 2,5x$10^3$IU/ml | H.K.NIELSEN Interferon Research Laboratory, Hjoerring Denmark |

2.1.3.2. Mock - Interferone und Inducer von IFN -$\gamma$

| | |
|---|---|
| Mock Präparation aus induziertem IFN-ß hitzeinaktiviert bei 41 °C, spez. Aktivität kleiner als 90 IU/mg | Fa.Rentschler |
| Inducer zur Herstellung von IFN -$\gamma$ | H.K.Nielsen Denmark |

## 2.1.4. Materialien für den Umgang mit Zellkulturen

| | | |
|---|---|---|
| Minimal Essential Medium (MEM)<br>mit Earles Salzen<br>Glutamin<br>Phenolrot<br>Bicarbonat 0,25 g/l<br>Hepes Puffer 20 mM<br>Gentamycin 50 µg/ml<br>Fetales Kälberserum 5%(FKS) | | RENTSCHLER Laupheim |
| Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert | | RENTSCHLER Laupheim |
| Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) Ca & Mg frei | | GISCO EUROPE |
| Ampuwa: steriles pyrogenfreies $H_2O$ | | FRESENIUS |
| Versen - Trypsin | | RENTSCHLER |
| Trypanblau, 0,4 % | | |
| Fuchs - Rosenthal - Zählkammer | | |
| Kulturflaschen, Plastik, 250 ml | NUNCON$^R$ | INTERMED |
| Laborzentrifuge | ROTIXA$^R$ | HETTICH |
| Zentrifugengläser,15 ml, konisch | | FALCON |
| Phasenkontrastmikroskop | IM$^R$ | OLYMPUS |
| Laminar Flow Area Fallstromprinzip | | CEAG SCHIRP Rheinraum-technik |
| Brutschrank | NATIONAL$^R$ | HEINEKE COM. |
| beschichtete Sechslochplatten mit Deckel 35 mm Ø, Fläche 9,62 $cm^2$, Inhalt 9,6 ml | | GREINER Labortechnik |
| Coulter Counter | COULTER Electronics | DUNATABLE England |

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Kultivierung der Zellinien

Alle Zellinien wurden als Monolayer in Kulturflaschen in MEM mit Zusätzen gehalten. Die konstanten Inkubatorbedingungen waren 37°C und 5 % $CO_2$, 95 % Luftfeuchtigkeit.
Die Zellen wurden alle 4 - 7 Tage passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgezogen und der Zellrasen mit 1 ml auf 37°C aufgewärmtem Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden in einigen ml warmem Medium suspendiert und 1:2 bis 1:10 verdünnt neu ausgesät.
Das Kulturmedium wurde alle 3 - 4 Tage erneuert.
Die Zellinien wurden 1 - 2 Tage vor dem jeweiligen Versuchsansatz passagiert. Hierdurch sollten zu Versuchsbeginn konstante Bedingungen herrschen in Hinsicht auf die das Zellwachstum hemmenden Faktoren Nährstoff und Raum.

#### 2.2.2.1 Monolayer Methode (36)

Die Zellen wurden - soweit nicht anders vermerkt - in einer Konzentration von $1 \times 10^5$ Zellen/Loch ausgesät.
Die Ausgangszellzahl wurde so ausgewählt, daß der Zellrasen nach 1 Woche die Plateauphase noch nicht erreicht hatte. Die in 1 ml gelösten Zellen wurden mit 2,6 ml MEM gemischt und anschließend wurde 0,4 ml HBSS mit oder ohne Medikament zugefügt.
Ein Loch enthielt somit in 4 ml $10^5$ Zellen.
Nach 4 Tagen wurde das MEM ohne erneute Medikamentenzugabe gewechselt.
Nach 1 Woche wurden die Platten ausgewertet.
Dazu wurde das MEM abgezogen, die Zellen mit 0,5 ml Trypsin/Loch abgelöst und in 2,5 ml MEM suspendiert.

Die Konzentration der Suspension wurde durch Zellzählung im Coulter Counter ermittelt. Von dieser Suspension wurden wieder $10^5$ Zellen/Loch ausgesät und wie zu Versuchsbeginn behandelt.

Bei den Versuchen wurde auf jeder Platte eine, insgesamt jedoch mindestens 6 Kontrollen mitgeführt. Die drei gleichbehandelten Versuchsansätze wurden auf verschiedene Platten verteilt, da die Platten unterschiedliche Wachstumsbegingungen boten.
Der Anteil der toten Zellen wurde mit Trypanblaufärbung ermittelt.
Eine Hemmung der Zellzahl wurde errechnet durch Bildung des Quotienten: $\frac{\text{Zahl behand. lebend. Zellen}}{\text{Zahl d. Zellen der Kontrolle}} \times 100$
Aus den Quotienten der gleichbehandelten Zellen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

2.2.2.2 Darstellung der in der Parallelarbeit von J. Buck benützten Semi-Soliden-Agarmethode

Bei dieser Methode werden zwei Agarschichten verschiedener Konsistenz übereinandergegossen; die untere, keine Zellen enthaltende Schicht wird als "Base layer", die obere zellhaltige Schicht als "Upper layer" bezeichnet.
Die Zellkulturen wurden zu Versuchsbeginn 1 x mit HBSS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Trypsin aus ihren Kulturflaschen gelöst und in warmem MEM suspendiert. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde die Lösung mehrmals kräftig auf- und abpipettiert. Nach Bestimmung der Zellzahl in der Fuchs - Rosenthal - Zählkammer oder im Coulter Counter wurde die Zellzahl in MEM so eingestellt, daß sich später im "Upper layer" $5 \times 10^4$ Zellen/ml befanden.

Die Zellen wurden jetzt je nach Versuchsart sofort dem "Upper - layer"- Gemisch zugefügt oder vorher noch eine bestimmte Zeit mit dem jeweiligen Medikament inkubiert.
Vor dem "Upper - layer" wurde der keine Zellen enthaltende "Base layer" aus angereichertem Medium und 0,5 % Agarose gegossen.
Danach wurde 1 ml "Upper - layer"- Lösung auf den bei Zimmertemperatur erstarrten Base layer gegossen. Diese "Upper - layer"- Lösung war aus Zellsuspension, angereichertem Medium und 0,3 % Agarose zusammengesetzt. Bei den Versuchen mit Interferon - Dauerexposition kam noch Interferon in die Lösung. Nach dem Festwerden wurde unter dem Mikroskop geprüft, ob die Tumorzellen wirklich als einzelne Zellen im "Upper layer" lagen.

Die Agarplatten wurden nun im Brutschrank bei 37° C, 5 % $CO_2$ inkubiert.
Aus einem bestimmten Teil der Zellen wurden Cluster und Kolonien. Cluster sind laut Definition solide Zellverbände aus 5 - 49 Zellen, Kolonien bestehen aus 50 und mehr Zellen (55).
Nach 14 - 21 Tagen wurde die Anzahl der Kolonien gezählt. Eine Kolonie enthielt ungefähr 100 Zellen.

Jeder Versuch wurde dreifach gemacht. Aus den drei erhaltenen Koloniezahlen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.
Die Hemmung der Koloniebildung wurde ermittelt durch Bildung des Quotienten:

$$\frac{\text{Zahl der behandelten Kolonien}}{\text{Zahl der Kontrollkolonien}} \times 100.$$

Die in dieser Arbeit zum Teil zum Vergleich mitdargestellten Ergebnisse der Agarmethode sind besonders gekennzeichnet (J. Buck).

2.2.3. Interferonansatz

Die benötigten Interferon - Konzentrationen wurden vor jedem Versuch aus definierten Vorverdünnungen mit HBSS hergestellt.
Es wurden 3,6 ml Zellsuspension jeweils 0,4 ml Interferonlösung zugesetzt. Einer Interferonkonzentration von 100 IU/ml entsprachen $4 \times 10^{-3}$ IU/Zelle.
Die in der parallel laufenden Arbeit mit der Agarmethode benützte gleiche Interferonkonzentration/ml entsprach $2 \times 10^{-3}$ IU/Zelle.
Die Interferonaktivitäten wurden mit dem Virusplaque - Reduktionsassay kontrolliert (29).

2.2.4. Zytostatikaansatz

Die Zytostatika wurden vor jedem Versuch aus standardisierten Klinikpackungen mit HBSS verdünnt.

## 2.2.5. Statistik

### 2.2.5.1. Allgemeine Statistik

Alle Versuche wurden dreifach durchgeführt. Aus den Ergebnissender gleichen Ansätze wurden Mittelwert und Standardabweichung ermittelt. Diese sind in den Zeichnungen entweder graphisch dargestellt oder tabellarisch angefügt.

### 2.2.5.2. Statistik der Kombinationsversuche

Für die Auswertung der Kombinationsversuche wurde ein von DREWINKO (33) verwendeter Test unter Berücksichtigung der Kovarianzen abgeändert.*

Bei dem Test setzten wir als Nullhypothese fest, daß die Wirkung beider Medikamente additiv sei, bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0{,}01$.

Als Additivität definierten wir die Bedingung

$S_{F_{AB}} = S_{F_A} \times S_{F_B}$ d.h. die Differenz

$D = S_{F_{AB}} - S_{F_A} \times S_{F_B} = 0$

$S_{F_A}$ = überlebende Zellen/Kolonien nach Medikament A

$S_{F_B}$ = überlebende Zellen/Kolonien nach Medikament B

$S_{F_{AB}}$ =überlebende Zellen/Kolonien Kombination von Medikament A + B

* Abänderung und Aufstellung des Computerprogramms von PD Dr. BRÜGGMANN, Kinderklinik Tübingen. Die Rechnung erfolgte auf einem HP 85 Computer von HEWLETT PACKARD.

Die Differenz D wurde anhand des Quotienten

$$U = \frac{D}{\text{Var } D}$$ geprüft. Unter der Annahme, daß D normalverteilt ist, wurde die Nullhypothese D = 0 verworfen, wenn $U \geq |2{,}58|$ ($\alpha = 0{,}01$) ist.

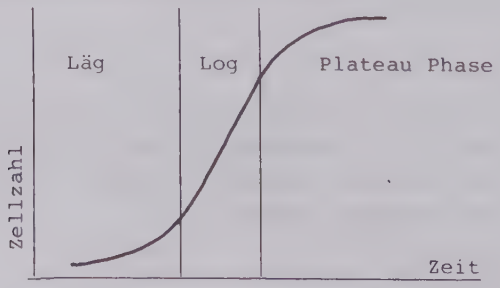
| U - Wert | Kombination 2er Medikamente |
|---|---|
| $U > + 2{,}58$ | antagonistisch mit einer Täuschungswahrscheinlichkeit 1 % |
| $+ 2{,}58 \geq U \geq -2{,}58$ | im additiven Bereich |
| $U < - 2{,}58$ | synergistisch mit einer Täuschungswahrscheinlichkeit 1 % |

## 2.2.6. Fehlerbetrachtung

### 2.2.6.1. Statistik

Eine Voraussetzung des Tests war die Normalverteilung von D; sie hat wegen der geringen Zahl der durchgeführten Versuche nur approximative Gültigkeit. Deshalb wurde zu Beginn ein hohes Signifikanzniveau ($\alpha \leq 0{,}01$) festgesetzt.
Über die Größe des Fehlers der 2. Art können mit dem Test keine Aussagen gemacht werden.

### 2.2.6.2. Wachstumsverhalten der Zellen



Die Zeichnung zeigt ein ideales Wachstumsverhalten bei konstanten Umweltbedingungen.

Zellen in Zellkulturen reagieren in den einzelnen Phasen der Wachstumskurve verschieden auf wachstumshemmende Substanzen (77).
Um zu erreichen, daß sich die meisten Zellen zu Versuchsbeginn in der log - Phase befanden, wurden die Kulturen 2 - 3 Tage vor Versuchsansatz passagiert.
Für eine sinnvolle Auswertung der Monolayer Versuche ist es notwendig, daß sich die Zellen während der Versuchsdauer in der logarhythmischen Wachstumsphase befanden. Die Zellen müssen daher in einer bestimmten, nicht zu hohen Konzentration angesetzt werden. Diese Zellzahl wurde in einem Versuch bestimmt.
Die Ergebnisse sind exemplarisch in Kapitel 3.1. dargestellt.

2.2.6.3. Umweltbedingungen

Optimales Wachstum hängt entscheidend von der Nährlösung ab. Um möglichst konstante Bedingungen zu erreichen, wurden sie immer von den gleichen Firmen bezogen. Die Qualität des FKS wechselte dennoch sehr stark. Es fiel auf, daß sich die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen auf verschiedenen Platten oft erheblich unterschied. Die gleichen Ansätze wurden deshalb auf verschiedene Platten verteilt und auf jeder Platte eine Kontrolle mitgeführt.

Ein weiterer Umweltfaktor sind die Brutschrankverhältnisse, die bei 37° C 5 % $CO_2$ und feuchtigkeitsgesättigter Luft konstant gehalten wurden. Die Zellen wurden nur kurzzeitig außerhalb gehalten.

2.2.6.4. Interferon

Die Ablesung der Titerstufe bei der Interferonbestimmung ist nur auf 2 Stufen genau.

In der Literatur wird berichtet (100), daß Zellen hoher Passagezahl unempfindlicher auf Interferon reagieren. Dies versuchte man dadurch zu umgehen, indem immer wieder eingefrorene Zellen mittlerer Passagezeit aufgetaut und verwendet wurden. Die Passagezeit bewegte sich bei den verschiedenen Zellinien zwischen 50 und 160.

2.2.6.5. Pipettierfehler

Pipettierfehler ergaben sich bei:

Zellverdünnung beim Versuchsansatz,
bei der Verdünnung der Medikamente und
bei der Medikamentenzugabe,
außerdem bei der Zellentnahme zur Zellzählung und der Rückverdünnung nach der 2. und 3. Woche.

2.2.6.6. Messfehler

Für die Zellzählung mit der Monolayer - Methode muß eine Einzelzellsuspension erhalten werden, da Verklumpungen zu einem fehlerhaften Ergebnis im Coulter Counter führen. Verunreinigungen in der Suspension werden auch mitgezählt.

Die Messung im Coulter Counter ist nur im Bereich von $10^5$ bis $10^6$ Zellen/ml relativ genau; es können sich Fehler ergeben bei starkem Abfall der Zellzahl im Medikamentenansatz.

Um zufällige Fehler zu minimieren, wurde im Versuchsablauf jeder Handgriff möglichst standardisiert.

## III. Ergebnisse

### 3.1. Ergebnisse der Wachstumskurven

Exemplarisch sind die Ergebnisse mit der SAOS-2 dargestellt.

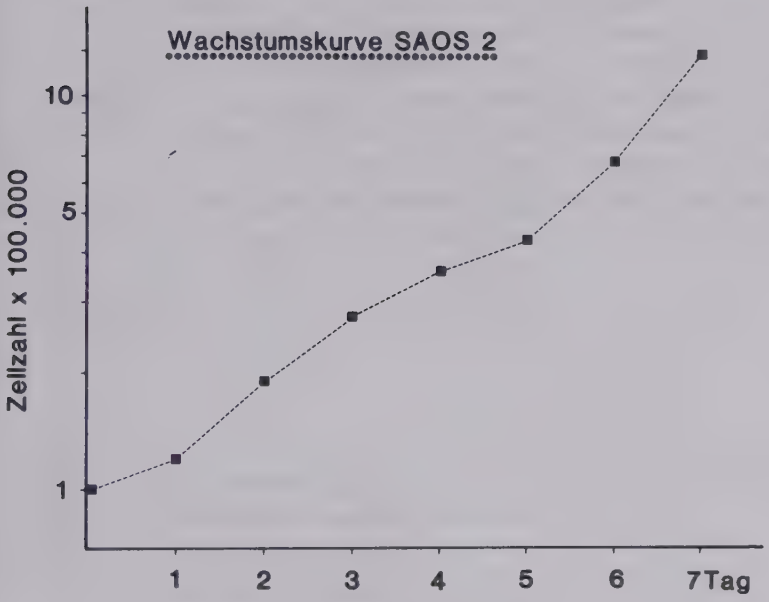



Abb. 1 zeigt die Ergebnisse bei der SAOS - 2 Wachstumskurve in halblogarhythmischer Darstellung, Standardabweichung 3 - 8 %.

Wie schon in Abschnitt 2.2.6.2. ausgeführt, ist ein logarhythmisches Wachstum der Zellen während der Versuchsdauer für eine sinnvolle Auswertung notwendig ( siehe auch 4.2). Das Wachstum ist abhängig von der ausgesäten Zellzahl pro Fläche und von der Beobachtungszeit bei sonst konstanten Bedingungen.
Aus arbeitstechnischen Gründen und aufgrund der Erfahrung

anderer Untersucher (36, 101) wurde als Beobachtungszeit 7 Tage und als Ausgangszellzahl 1 x $10^5$ Zellen pro Loch gewählt, das entspricht etwa $10^4$ Zellen/$cm^2$. Von 8 gleichen Ansätzen wurde jeden Tag einer ausgewertet.

Die halblogarhythmische Darstellung in Abb. 1 macht das erwartete exponentielle Wachstum durch die erste Ableitung als Gerade sichtbar. Durch die lineare Regression wurde ein Korrelationskoeffizient von $r = + 0{,}95$ * ermittelt. Für die Gerade ergab sich folgende Gleichung: $y = 0{,}56\ x + 1{,}12$.
Die Zellen befinden sich also während der Versuche in der log - Phase, sie vermehren sich exponentiell.

* wobei $-1 \leq r \leq +1$ ; $r = 0$ : keine Korrelation
$r = +1$ : Punkte liegen auf einer Geraden mit positiver Steigung
$r = -1$ : Punkte liegen auf einer Geraden mit negativer Steigung

## 3.2. Vergleich der Zellinien in ihrer Empfindlichkeit gegenüber der Dauerexposition mit Interferon - ß

### 3.2.1. Monolayer Methode

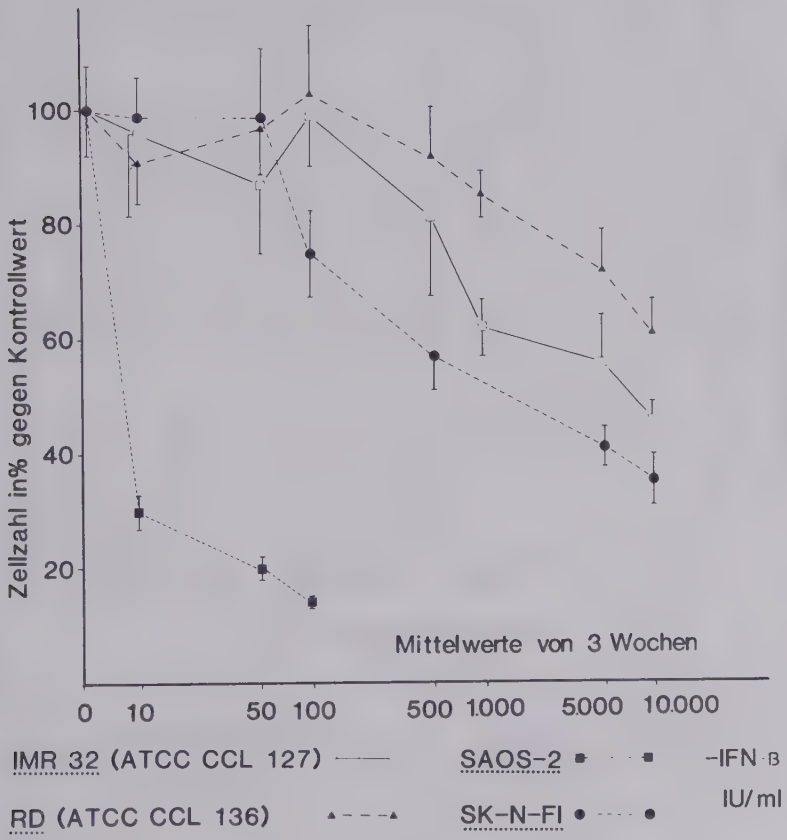



Abb. 2 Dosiswirkungskurven der 4 Zellinien gegen IFN-ß mit der Monolayer Methode. Ausgangszellzahl $10^5$/Loch.

3.2.2. Agar Methode (Ergebnisse von J. Buck)

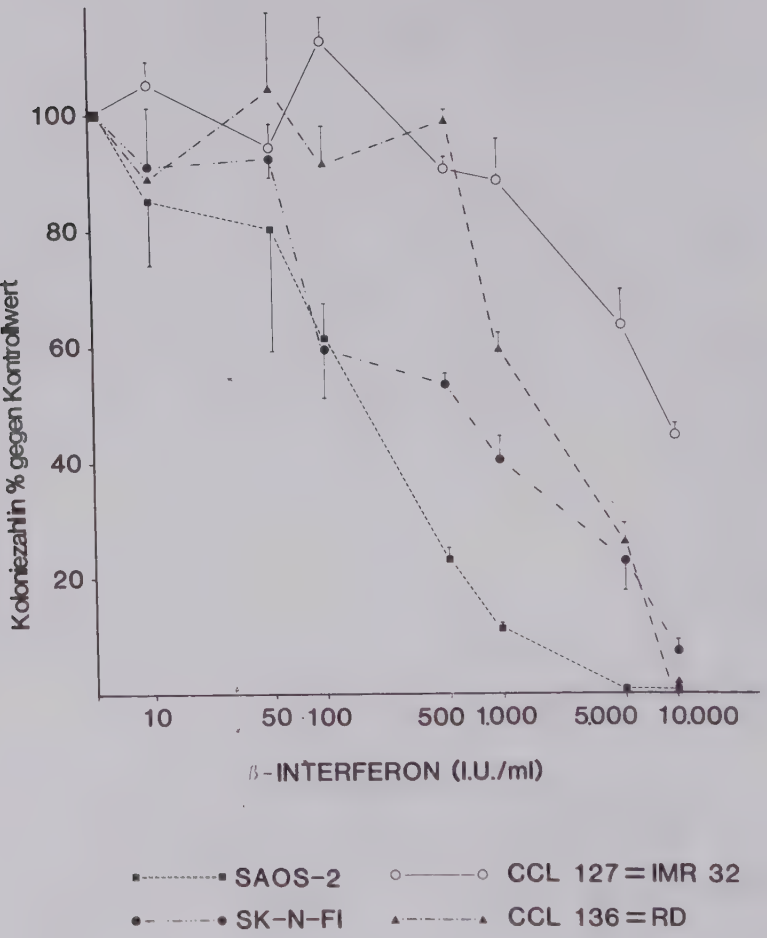



Abb. 3 Dosiswirkungskurven der 4 Zellinien gegen Interferon-ß mit der Agar Methode. Ausgangszellzahl 5 x $10^4$/Loch.

Zu 3.2.1.

In Abb. 2 fällt zunächst die extreme Empfindlichkeit der osteogenen Sarkomzellinie SAOS - 2 auf. Bereits bei 10 IU/ml IFN - ß sinkt die Zellzahl auf 25 % gegenüber dem Kontrollwert ab. Das ist ein geringerer Wert als bei den drei anderen Zellinien bei 10 000 IU/ml erreicht wurde.
Von den drei anderen Zellinien, deren Kurvenverlauf bei halblogarithmischer Darstellung fast parallel ist, ist die Neuroblastomlinie SK - N - FI die nächst empfindliche. Ab 100 IU/ml IFN - ß mit einer Zellzahl von 75 % fällt sie dann über 57 % bei 500 IU/ml auf 35 % bei 10 000 IU/ml ab.

Die andere Neuroblastomlinie IMR - 32 fällt deutlich erst bei der 10-fachen Interferon - Konzentration ab, nämlich ab 1 000 IU/ml IFN - ß. Bei 10 000 IU/ml beträgt die Zellzahl nach 3 Wochen noch 55 % gegenüber dem Kontrollwert.
Bei dem Monolayer - Versuch ist die Rhabdomyosarkomlinie RD am unempfindlichsten gegenüber IFN - ß. Ihre Zellzahl sinkt bei 1 000 IU/ml leicht ab. Über 72 % bei 5 000 IU/ml erreicht sie 61 % bei einem Interferon - Spiegel von 1o ooo IU/ml.

Zu 3.2.2.

Bei der kolonienbildenden Methode (Abb. 3) ist wie bei der Monolayer Methode die SAOS - 2 Linie die empfindlichste der vier untersuchten Zellinien. Bei Dauer - Exposition mit 10 IU/ml IFN - ß fällt die Koloniezahl auf 85 % gegenüber der Kontrolle ab.
Bei 100 IU/ml IFN - ß beträgt die Koloniezahl 61 %, bei 1 000 IU/ml 11 %, und bei 5 000 und 10 000 IU/ml bilden sich keine Kolonien mehr.
Von den beiden Neuroblastomzellinien ist die SK - N - FI - Linie wie bei Monolayer die empfindlichere. Sie fällt schon bei 100 IU/ml IFN - ß auf 59 % ab, wogegen die IMR - 32 Zellinie eindeutig erst bei 5 000 IU/ml IFN - ß (63 %) reagiert.

Die Rhabdomyosarkomlinie ist bis 500 IU/ml gegenüber IFN - ß resistent und fällt bei 1 000 IU/ml auf 60 % Kolonien gegenüber der Kontrolle ab. Bei 10 000 IU/ml IFN - ß werden nur noch 1 % Kolonien gegenüber der Kontrolle gebildet.
Die bei hohen Interferondosen erhaltenen Kolonien waren kleiner als die Kontrollkolonien.

3.2.3. Vergleich der Ergebnisse

Das Interferon wurde bei der Monolayer Methode in jeder der drei Wochen für 4 Tage jeweils neu dem Medium zugefügt. Bie der koloniebildenden Methode war die Interferon - Lösung Bestandteil des Upper Layers.
Bei beiden Methoden ist die Osteosarkomlinie SAOS - 2 die empfindlichste Zellinie. Beides mal beginnt der Abfall schon bei 10 IU/ml IFN - ß. Jedoch scheint diese Zellinie bei der Monolayer Methode im Verhältnis zu den anderen Zellinien stärker gehemmt zu werden.

Von den beiden Neuroblastomzellinien ist bei beiden Methoden die SK - N - FI - Linie die empfindlichere. (Abfall ab 100 IU/ml IFN - ß), die IMR - 32 - Linie die resistentere (Abfall bei 1 000 IU/ml bzw. 5 000 IU/ml IFN - ß).

Die Rhabdomyosarkomlinie RD ist beides mal relativ resistent (Abfall ab 1 000 IU²ml IFN - ß). Jedoch ist sie in der Monolayer Methode im Gegensatz zur Agarmethode unempfindlicher wie die IMR - 32 - Zellinie. Bei der koloniebildenden Methode fällt die RD - Linie bei hohen Interferonkonzentrationen relativ steil ab.

Für die Versuche mit verschiedenen anderen Interferonen (3.4., 3.5.), sowie mit Mock - Interferon (3.3.) und für die Zeitversuche mit IFN - ß (3.6.) wurde die gegen IFN-ß sehr sensible SAOS - 2 - Linie und die relativ resistente IMR - 32 - Zellinie verwendet.

3.2.4. Verlaufskurven der Zellinien über 3 Wochen mit ansteigenden IFN - ß Konzentrationen mit der Monolayer Methode

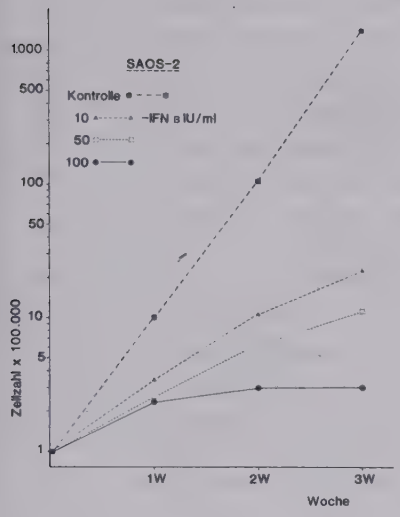



Abb. 4a

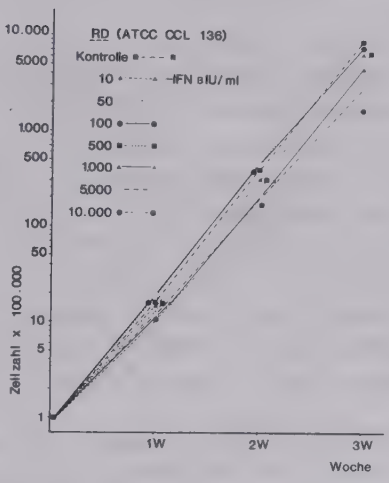



Abb. 4b

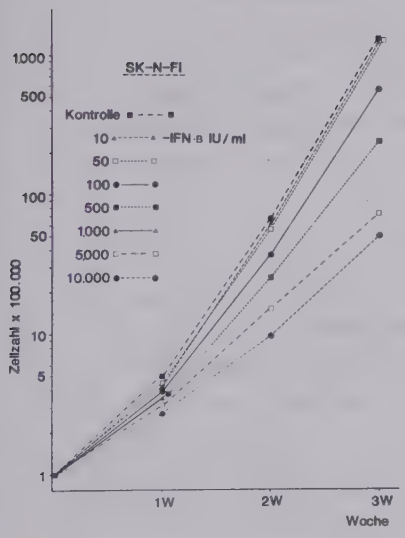



Abb.4c

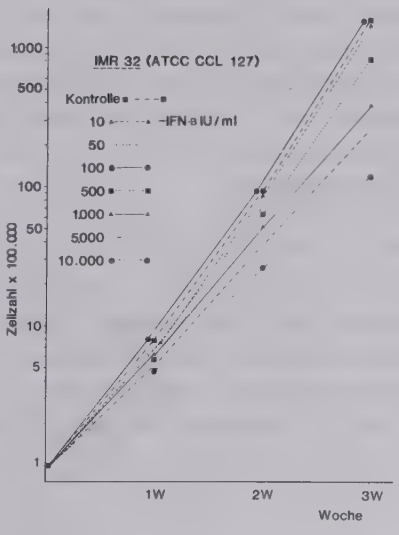



Abb.4d

Abb. 4 Wachstumskurvenverlauf über 3 Wochen mit verschiedenen Konzentrationen IFN - ß.

Die Wochenergebnisse sind aufmultipliziert.
Standardabweichung 3 - 14 %.

Es wurde versucht, das Wachstum eines Tumorzellverbandes in vivo zeichnerisch zu simulieren.
Unter der Annahme eines exponentiellen Wachstums (siehe 3.1.) wurden die Ergebnisse, d.h. die Zellzahl, logarithmisch als Ordinate und die Wochen linear in der Abszisse aufgetragen.
Die Wochenergebnisse wurden in folgender Weise aufmultipliziert:
Ergebnis nach 1. Woche = Zellzahl (Zz.) nach 1. Woche
Ergebnis nach 2. Woche = Zz. der 1. Woche x Zz. der 2.Woche
Ergebnis nach 3. Woche = Zz. der 1. x 2. x 3. Woche

In Abb. 4a sind in dieser Weise die Monolayerergebnisse bei der SAOS - 2 dargestellt.
Die Ergebnisse der Kontrolle ergeben eine eindeutige Gerade und somit ein logarithmisches Wachstum über 3 Wochen. Bei 10 und 50 IU/ml IFN - ß flacht die Kurve schon sehr stark ab, die Zellen vermehren sich aber noch. Mit 100IU/ml sistiert das Wachstum nach der 2. Woche. Nach 3 Wochen wäre der Kontrolltumor gegenüber dem mit 10 IU/ml behandelten Tumor $10^3$ mal und dem mit 100 IU/ml behandelten $10^4$ mal größer.

Abb. 4b zeigt die Ergebnisse mit der RD - Linie.

Die Kontrolle wächst wieder logarithmisch. Die Zellinie reagiert mit einer wesentlich geringeren Vermehrungshemmung auf die Interferonbehandlung. Nach 3 Wochen besteht der Kontrolltumor erst aus $10^2$ mal mehr Zellen als der mit 1 000 IU/ml behandelte Tumor.

Abb. 4c Ergebnisse der SK - N - FI

Hier wird das Kontrollwachstum, bedingt durch einen systematischen Fehler in der 1. Woche (alle Zellen haben sich langsamer vermehrt) nicht durch eine Gerade dargestellt.
Der mit 500 IU/ml behandelte Tumor besteht nach 3 Wochen noch aus 1 %, der mit 1 000 IU/ml behandelte aus 0,1 % der Zellen des Kontrolltumors.

In Abb. 4d sind die Ergebnisse der IMR 32 aufgezeichnet.

Die Kontrolle wird wieder durch die Gerade dargestellt.
Diese Neuroblastomlinie ist deutlich weniger empfindlich als die SK - N - FI.
Mit 5 000 IU/ml IFN - ß wird das Wachstum erst auf 1 % des Kontrollwachstums vermindert.

## 3.3. Wachstumshemmende Wirkung der Mock - Präparation (wärmeinaktiviertes IFN - ß)

### 3.3.1. Ergebnisse der SAOS - 2

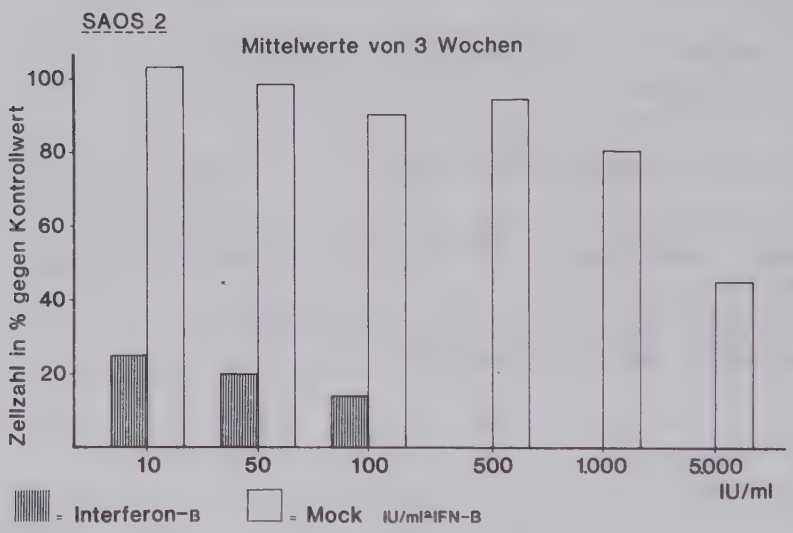



Abb. 5 Wachstumshemmende Wirkung von verschiedenen IFN - ß und Mockkonzentrationen. Ausgangszellzahl $10^5$/Loch mittlere Standardabweichung 3 - 12 %

Abb. 5 + 6 zeigen bei der SAOS - 2 bzw. IMR - 32 - Zellinie die Mittelwerte, die man nach drei-wöchiger Behandlung mit IFN - ß und dessen Mock - Präparat erhielt.

Bei der SAOS - 2 - Linie zeigt IFN - ß bei 10 IU/ml schon eine sehr starke Wirkung mit einem Abfall der Zellzahl auf 25 % gegenüber dem Kontrollwert. Die Mock - Präparation zeigt bis zu einer Konzentration, die 500 IU/ml IFN - ß entspricht,keine Wirkung. Mit entsprechend 1 000 IU/ml Mock wurde ein leichter Effekt (Abfall auf 80 %), mit 5 000 IU/ml Mock ein deutlich wachstumshemmender Effekt mit einem Abfall auf 45 % der Kontrolle gemessen.

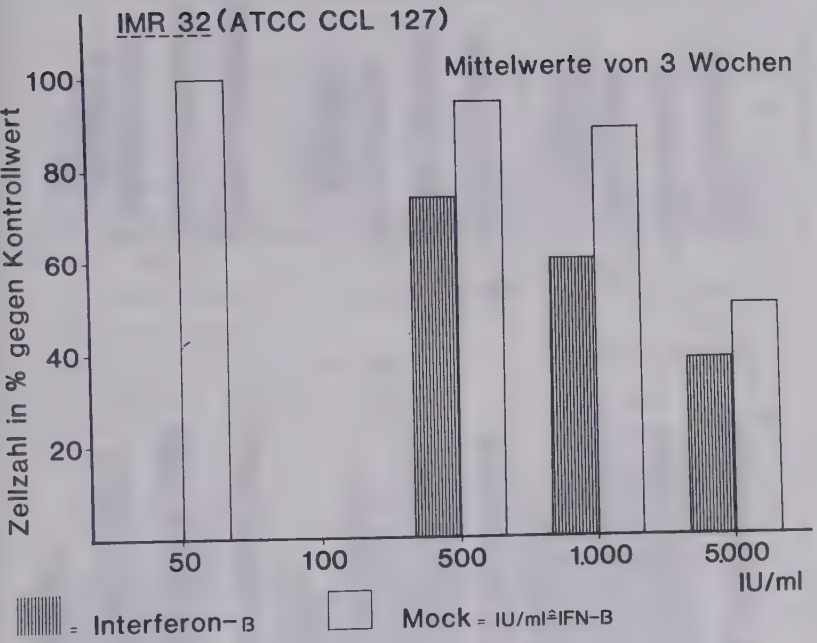



Abb. 6 Wachstumshemmende Wirkung von verschiedenen IFN - ß und Mockkonzentrationen, Ausgangszellzahl $10^5$/Loch mittlere Standardabweichung 4 - 13 %.

Bei der IMR - 32 - Linie wird erst mit 1 000 IU/ml IFN - ß ein deutlich wachstumshemmender Effekt (Abfall auf 61 %), mit 5 000 IU/ml IFN - ß ein starker Effekt (Abfall auf 39 %) gemessen.
Mit Mock - Präparat wurde bei entsprechend 5 000 IU/ml ein Abfall auf 51 % gegenüber der Kontrolle erzielt; das sind nur 12 % weniger als bei der entsprechenden Menge IFN - ß.

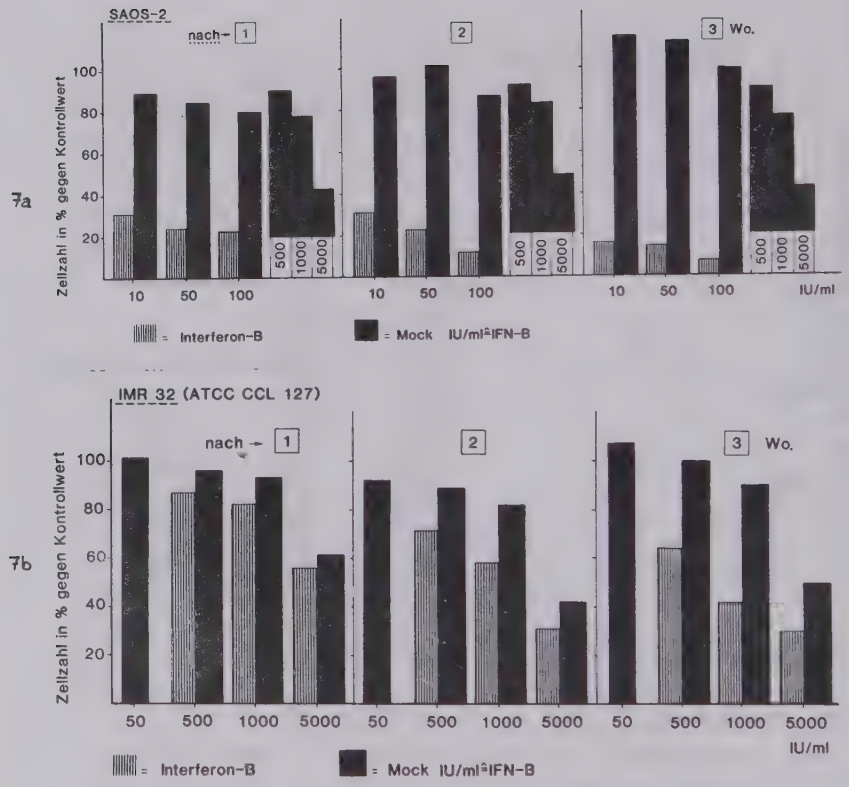



Abb. 7a und 7b zeigen die Mock - Ergebnisse der SAOS - 2 und IMR - 32 Zellinie nach Wochen getrennt.

Bei der SAOS - 2 - Linie (Abb. 7a) wirkt die Mock - Präparation in den verschiedenen Konzentrationen über alle drei Wochen gleich, während sich der IFN - Effekt (mit wesentlich niederer Konzentration) über die drei Wochen verstärkt; bei 100 IU/ml IFN - ß Abfall von 23 % in der ersten Woche auf 8 % in der dritten Woche, bei 10 IU/ml Abfall von 31 % auf 16 %.

Bei der IMR - 32 - Zellinie (Abb.7b) geht bei 5 000 IU/ml der Abfall der Zellzahl durch Interferon dem Abfall durch Mock in etwa parallel. Bei 500 IU/ml und 1000 IU/ml verstärkt sich der Abfall des Interferons im Gegensatz zum Mockpräparat über die 3 Wochen und ist wesentlich stärker.

3.3.2. Vergleich der Mockergebnisse der Monolayer Methode mit denen der Agarmethode (J. Buck)

Tabellarischer Vergleich

| SAOS - 2 | Monolayer | Agar |
|---|---|---|
| 100 IU IFN - ß | 15 % | |
| 100 IU Mock | 90 % | |
| $10^3$ IU IFN - ß | | 16 % |
| $10^3$ IU IFN Mock | | 86 % |
| $10^4$ IU anti-IFN-ß * | | 100 % |
| $10^3$ IU IFN-ß + $10^4$ IU anti-IFN | | 81 % |
| $10^3$ IU Mock + $10^4$ IU anti-IFN | | 86 % |
| 5 x $10^3$ IU Mock | 45 % | |

* Aus menschlichem Serum gewonnene Antikörper gegen IFN - ß ; 1 ml inaktiviert $10^4$ IU IFN - ß.

| IMR 32 | Monolayer | Agar |
|---|---|---|
| $10^3$ IU IFN - ß | 61 % | 62 % |
| $10^3$ IU Mock | 88 % | 79 % |
| $10^4$ IU anti-IFN - ß | | 100 % |
| $10^3$ IU Mock + $10^4$ IU anti-IFN-ß | | 72 % |
| 5 x $10^3$ IU IFN - ß | 39 % | |
| 5 x $10^3$ IU Mock | 51 % | |

Bei beiden Linien und beiden Methoden ist der wachstumshemmende Mock-Effekt qualitativ und quantitativ gleich stark ausgeprägt. Er beginnt bei einer Mock-Konzentration, die 1000 IU/ml IFN - ß entspricht (1000 IU/ml : SAOS - 2 80% / 86%, IMR - 32 88% / 79%) und ist bei 5 000 IU/ml deutlich ausgeprägt (5 000 IU/ml : SAOS - 2 45% / 56%, IMR - 32 51%).

3.4. Vergleich des antiproliferativen Effekts von verschiedenen alpha und beta Interferonen

Es standen 3$\alpha$ - und 2 ß - Interferone zur Verfügung; jedoch von E.coli IFN - $\alpha_2$, Lymphoblasten - IFN -$\alpha$ (Namalva) und reinem IFN - ß (Knight) nur geringe Mengen.

3.4.1. Ergebnisse der SAOS - 2

Diese Interferone wurden an 2 Linien, der empfindlichen SAOS - 2 und der relativ resistenten IMR 32, getestet.

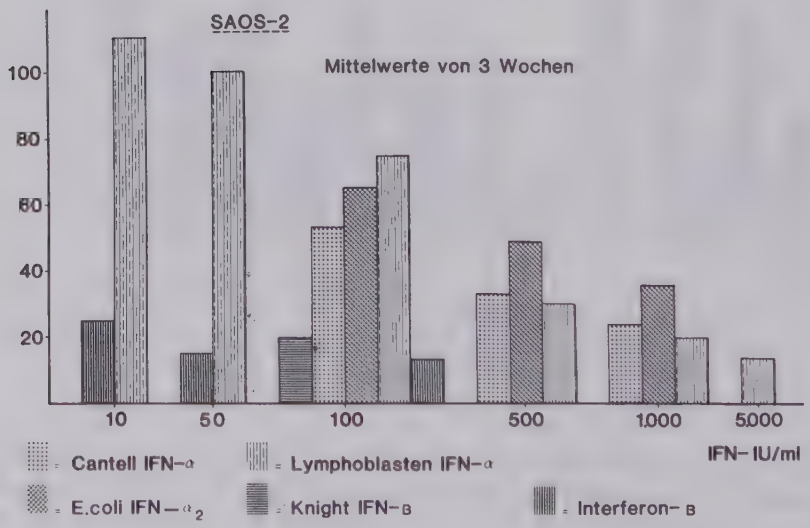



Abb. 8 Wachstumshemmender Effekt verschiedener IFN -$\alpha$ und IFN - ß. Standardabweichung 2 - 12 %.

Die SAOS - 2 (Abb. 8) reagiert auf alle Interferone sensibel mit einem dosisabhängigen Abfall der Zellzahl.

Für die einzelnen Interferone ergibt sich bei der SAOS - 2

| IFN -α | 100 IU/ml | 1 000 IU/ml |
|---|---|---|
| Cantell | 52 % | 24 % |
| E. Coli | 65 % | 36 % |
| Lymphoblasten | 75 % | 20 % |
| IFN - ß | | |
| Knight | 20 % | - |
| Rentschler | 15 % | - |

Die beiden beta Interferone sind gegenüber dem relativ "homogenen" Block der alpha Interferone stärker anti-proliferativ.

3.4.2. Ergebnisse der IMR - 32

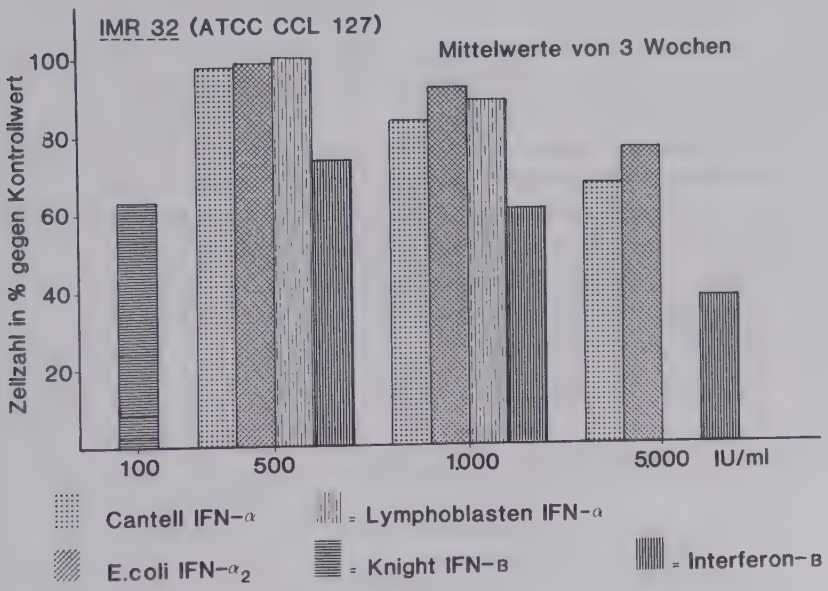



Abb. 9 Wachstumshemmender Effekt verschiedener IFN - α und IFN - ß. Standardabweichung 4 - 15 %.

Für die einzelnen Interferone ergibt sich bei der IMR - 32

| | | 100 IU/ml | 500 IU/ml | 1 000 IU/ml |
|---|---|---|---|---|
| IFN -α | | | | |
| | Cantell | - | 97 % | 84 % |
| | E. Coli | - | 98 % | 91 % |
| | Lymphoblasten | - | 101 % | 88 % |
| IFN - ß | | | | |
| | Knight | 63 % | - | - |
| | Rentschler | - | 74 % | 61 % |

Auch hier bilden die alpha Interferone einen "homogenen" Block gegenüber den viel wirksameren beta Interferonen.

Vergleich der beiden Linien:
Beide Linien sind gegen alle Interferone empfindlich, wobei die SAOS - 2 mit einer wesentlich stärkeren Reduktion reagiert als die IMR - 32.
Die etwa gleich potenten α - Interferone sind bei beiden Linien erheblich weniger wirksam als die ß - Interferone. Dieser Unterschied ist bei der SAOS - 2 ausgeprägter.

Mit Cantell'schem und Lymphoblasten Interferon war der Abfall der Zellzahl etwa gleich groß und etwas stärker als mit E. coli IFN. Von den effektiveren ß - Interferonen scheint das höher gereinigte Knight'sche Interferon besonders bei der relativ resistenten IMR - 32 eine größere Reduktion zu bewirken.

## 3.5. Vergleich der wachstumshemmenden Wirkung von IFN - ß mit IFN - γ

Im letzten Ansatz dieser Versuchsreihe wurde die antiproliferative Wirkung des IFN - ß mit derjenigen von IFN - γ verglichen.
Da IFN - γ nicht rein zur Verfügung stand, mußte man als zusätzliche Kontrolle den Inducereinfluß für dieses IFN - γ prüfen. Dieser Inducer zeigte in allen Versuchen keine Wirkung.

### 3.5.1. Ergebnisse mit der SAOS - 2

In Abb. 10 und 11 wurde die Zellzahl in folgender Weise in Prozent der Kontrolle aufgetragen:

| Ergebnis nach | Zellzahl nach | in % der Zellzahl der Kontrolle der |
|---|---|---|
| 1. Woche | 1. Woche | 1. Woche |
| 2. Woche | 1. Woche x 2. Woche | 1. Woche x 2.Woche |
| 3. Woche | 1. x 2. x 3. Woche | 1. x 2. x 3. Woche |

Durch diese Art der Darstellung wird der Wachstumsverlauf der Zellen bzw. des Tumors unter äußeren optimalen Bedingungen und Interferonbehandlung über 3 Wochen simuliert. Man sieht als Ergebnis die relative Wachstumshemmung zur Kontrolle bzw. das Zurückbleiben der Tumorgröße nach Interferonbehandlung.

Die Prozentzahl in der Tabelle gibt die Größe des behandelten zum Kontrolltumor an.

| IFN - ß | 2,5 IU/ml | 25 IU/ml | 250 IU/ml |
|---|---|---|---|
| nach 1.Woche | - | 35 % | 23 % |
| nach 2.Woche | - | 8 % | 2 % |
| nach 3.Woche | - | 1 % | unter Nachweisgrenze |
| **IFN - γ** | | | |
| nach 1.Woche | 66 % | 39 % | 16 % |
| nach 2.Woche | 31 % | 7 % | 0,9 % |
| nach 3.Woche | 10 % | 0,7 % | unter Nachweisgrenze |

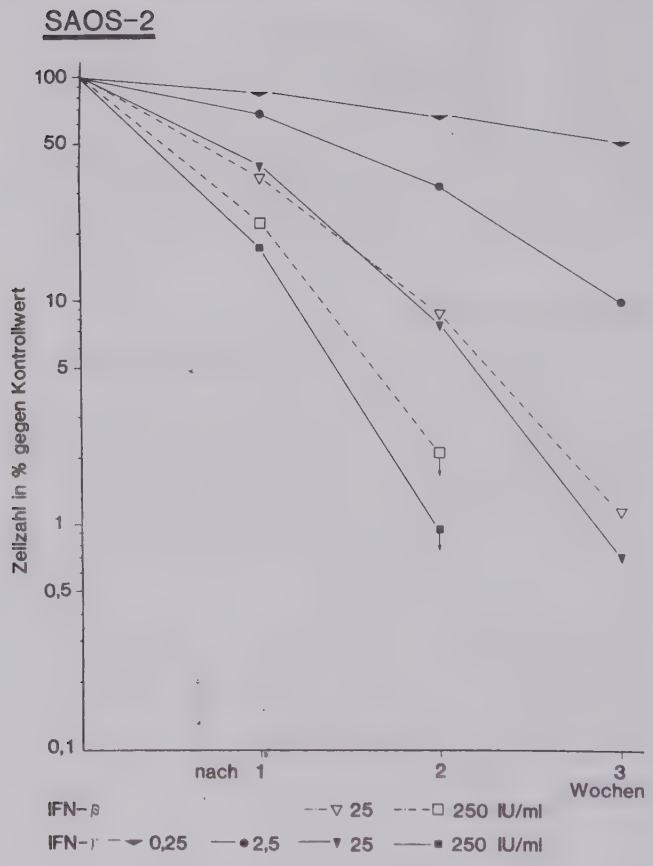



Abb. 10 Vergleich von IFN - ß mit IFN - γ .
Standardabweichung 3 - 12 %.

Bei der SAOS - 2 - Linie ist IFN - γ nur wenig antiproliferativ wirksamer als IFN - ß bei gleicher antiviraler Aktivität.

3.5.2. Ergebnisse mit der IMR - 32

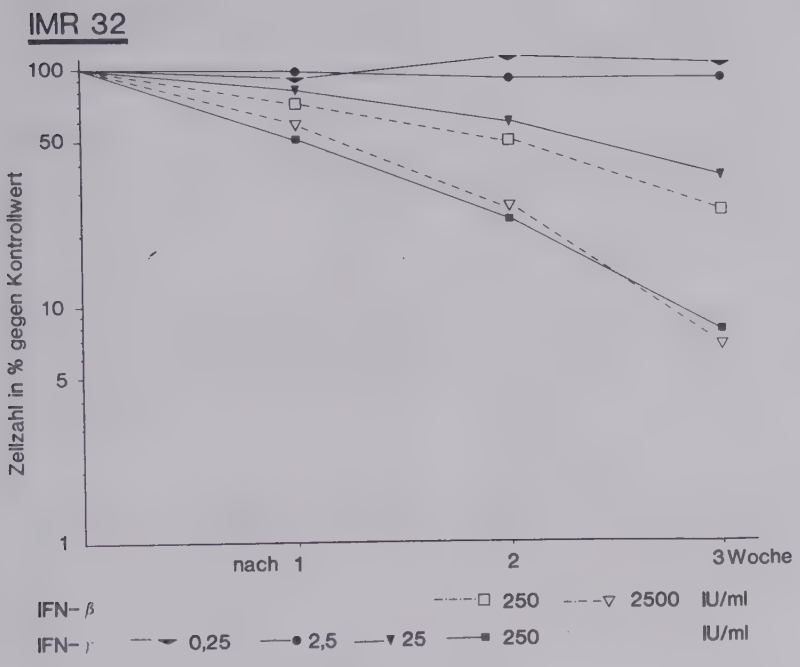



Abb. 11 Vergleich von IFN - ß und IFN - γ
Standardabweichung 4 - 15 %.

Die nachfolgende Tabelle vermittelt in gleicher Weise die Ergebnisse mit der IMR - 32.

| IFN - ß | 25 IU/ml | 250 IU/ml | 2 500 IU/ml |
|---|---|---|---|
| nach 1. Woche | - | 77 % | 57 % |
| nach 2. Woche | - | 50 % | 24 % |
| nach 3. Woche | - | 26 % | 6 % |
| IFN - γ | | | |
| nach 1. Woche | 80 % | 51 % | |
| nach 2. Woche | 61 % | 23 % | |
| nach 3. Woche | 37 % | 8 % | |

Um denselben antiproliferativen Effekt wie IFN - γ auszuüben, ist bei dieser Linie eine IFN - ß Konzentration mit fast 10-facher antiviraler Aktivität notwendig.

## 3.6. Zeitbegrenzte Interferon - Exposition der Zellinien

### 3.6.1. Ergebnisse nach einmaliger Interferonexposition

Im ersten Versuch wurde die SAOS - 2 - Linie nur einmal zu Versuchsbeginn Interferon für 10 min., 30 min., 120 min. und 4 Tage ausgesetzt und anschließend 3 Wochen beobachtet. Die Zellen wurden nach Interferon - Exposition 2 x gewaschen, und bei jedem Ansatz wurde eine Kontrolle mitgeführt, an der die Reduktion gemessen wurde.

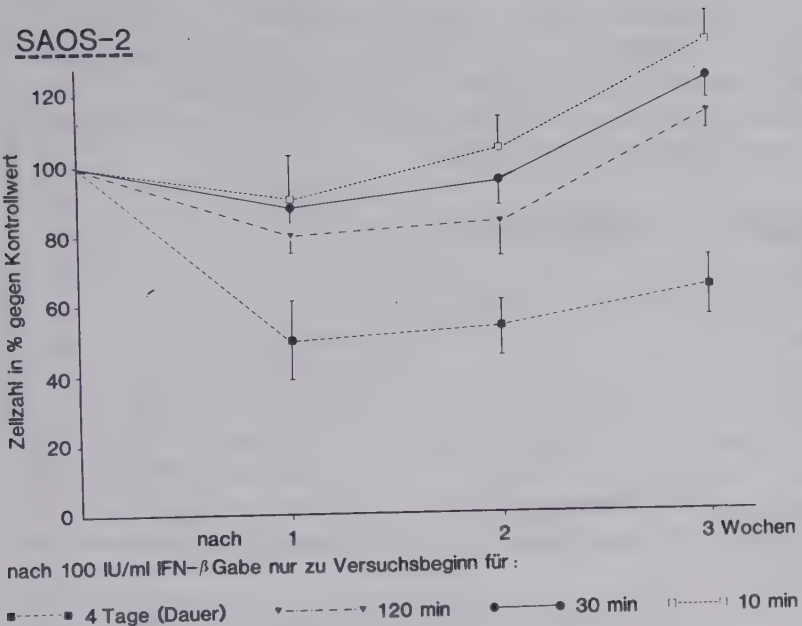



Abb. 12 Antiproliferativer Effekt des IFN - ß nach nur einmaliger zeitbegrenzter Exposition

Bei 4-tägiger Exposition (Abb. 12) wurde nach der ersten Woche eine Reduktion der Zellzahl auf 50 % gemessen. Ohne erneute Interferonzugabe erholte sich die Zellinie (im Gegensatz zur wiederholten Interferonzugabe s. 3.2.)langsam mit einer Reduktion auf 65 % nach der 3. Woche.
Einmalige Interferonexposition für 120 min war nur wenig wirksam mit einem Abfall der Zellzahl auf 81 % nach der 1. Woche. Nach der 3. Woche erholten sich auch hier die Zellen auf 115 %. 10-minütige und 30-minütige Interferonexposition bewirkten mit einem Abfall auf nur 89 % bzw. 88 % praktisch keine Reduktion. Die Zellen erholten sich schon nach der 2. Woche mit einem Anstieg auf 105 % bzw. 96 %. Nach der 3. Woche wurde das Wachstum sogar auf 134 % bzw. 124 % stimuliert.

3.6.2. Ergebnisse nach mehrmaliger Interferonexposition

Es sollte geprüft werden, ob sich nach mehrmaliger kurzzeitiger Interferonexposition der geringe wachstumshemmende Effekt addiert. Deshalb wurde ein Versuch mit 30-minütiger und 4-tägiger wöchentlicher Interferonexposition mit allen Zellinien durchgeführt.

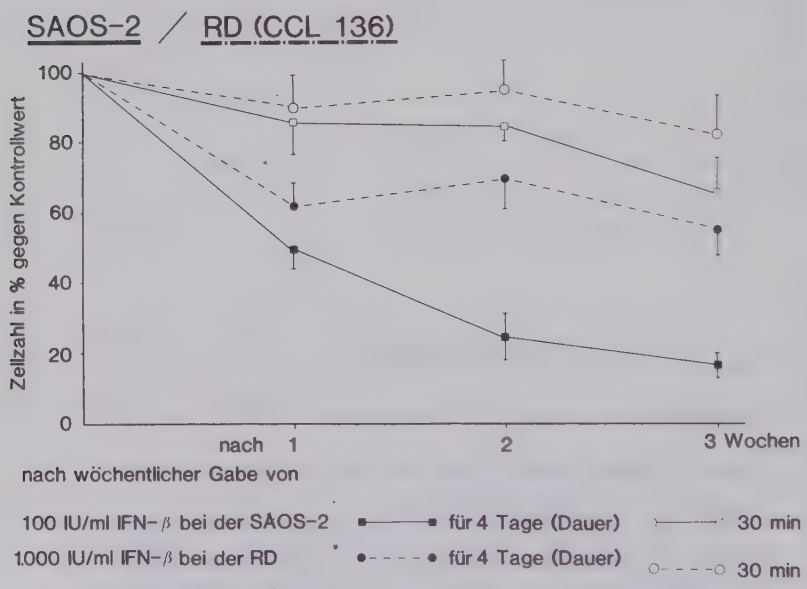



Abb. 13 Antiproliferativer Effekt des IFN - ß nach wöchentlicher zeitbeschränkter Exposition

4-tägige Exposition mit 100 IU/ml IFN - ß bewirkten bei der SAOS - 2 über 3 Wochen einen fortschreitenden Abfall der Zellzahl auf 50 %, 24 % und 15 %. Mit 30-minütiger Exposition wurde eine, allerdings wesentlich geringere Reduktion auf 86 %, 84 % und 66 % gemessen. Bei wöchentlicher Gabe von 1 000 IU/ml IFN - ß reagierte die RD Linie bei 4-tägiger Exposition mit einer Verminderung der Zellzahl auf 62 %, 70 % und 55 %, bei 30-minütiger Exposition auf 90 %, 92 % und 82 %.

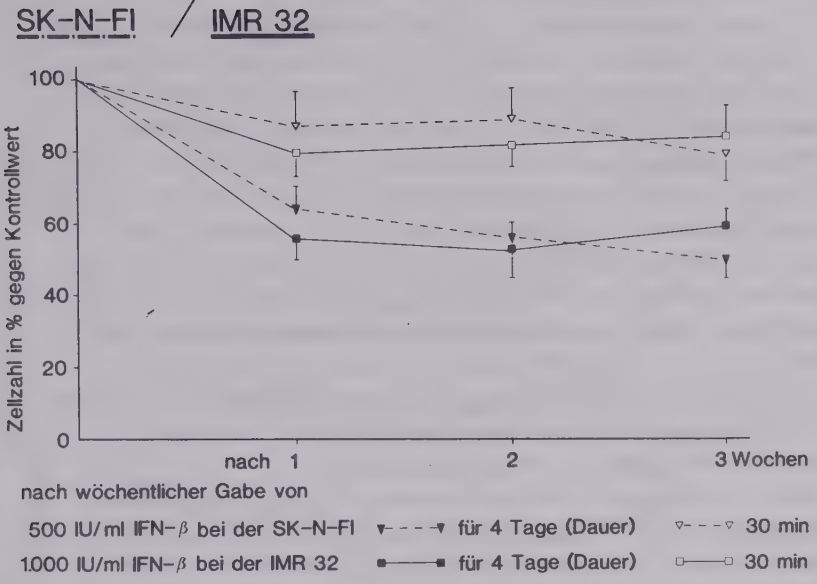



Abb. 14 Antiproliferativer Effekt des IFN - ß nach wöchentlicher zeitbeschränkter Exposition

Die empfindlichere Neuroblastomlinie SK - N - FI (Abb. 14) wurde nach 4-tägiger Exposition mit 500 IU/ml IFN - ß auf 65 %, 57 % und 48 % reduziert und fiel bei 30-minütiger Exposition auf 86 %, 89 % und 80 % ab.
Bei der IMR - 32 (1 000 IU/ml) wurde mit wöchentlicher 4-tägiger Exposition eine Reduktion auf 57 %, 54 % und 60 %, bei 30-minütiger Exposition auf 80 %, 85 % und 89 % gemessen.
Für alle Zellinien gilt, daß 4-tägige Exposition (Dauer) wesentlich wirksamer ist und nur durch sie bei den verwendeten Interferonkonzentrationen eine Reduktion auf unter 60 % der Kontrolle erreicht werden kann.

### 3.6.3. Induktion der 2' - 5' Synthetase

Der Aktivitätsgrad der (2' - 5') Oligoisoadenylsynthethase entspricht dem durch Interferon induzierbaren antiviralen, nicht dem antiproliferativen Status der Zellen (88). Jeweils 5 x $10^5$ Zellen wuchsen für 24 h als Monolayer in Kulturflaschen an, wurden dann für die jeweilige Zeit IFN ausgesetzt, das danach abgewaschen wurde. Einen Tag danach wurde der Aktivitätsgrad der Synthetase bestimmt (30).*1
Abb. 15 oben zeigt die Ergebnisse beider SAOS-2 Linie nach der Exposition mit 100 IU/ml IFN-ß. Die Aktivität der Synthetase stieg kontinuierlich an (Kontrolle 1 070 CPM*2, nach 10' auf 2 354 CPM, nach 60' auf 8 936 CPM und 120' auf 48 129 CPM). Mit 1 000 IU/ml IFN-ß stieg die Aktivität der Synthetase bei der SAOS-2 bereits nach 10' auf 25 114 CPM (graphisch nicht dargestellt).
Die RD Linie (Abb.15 Mitte) wurde mit 1 000 IU/ml IFN-ß inkubiert. Nach 10' war die Wirkung mit 55 850 CPM schon halb so hoch wie nach Dauerexposition mit 103 489 CPM (Kontrolle 145 CPM).
Die Zellen der IMR 32 Linie ( Abb. 15 unten ) wurden 5 000 IU/ml IFN - ß ausgesetzt. Nach 10' war die Aktivität der 2' - 5' Synthetase von 365 CPM auf 61 355 CPM gestiegen. Die Dauerexposition zeigte 80 425 CPM.

Wie die Ergebnisse veranschaulichen, wird die antivirale Aktivität des Interferon bereits durch 10' Exposition induziert (man beachte den mit 1 000 IU IFN nicht dargestellten Wert bei der SAOS - 2). Während die Ergebnisse mit der Monolayer Methode zeigen, daß zum Erreichen einer antiproliferativen Wirkung deutlich längere Expositionszeiten (mehr als 2h) notwendig sind.

*1 Die Messung der Synthetaseaktivität wurde freundlicherweise von Frau cand. med. IRENE THOMAE durchgeführt.

*2 CPM = counts per minute im Szintilationszähler.

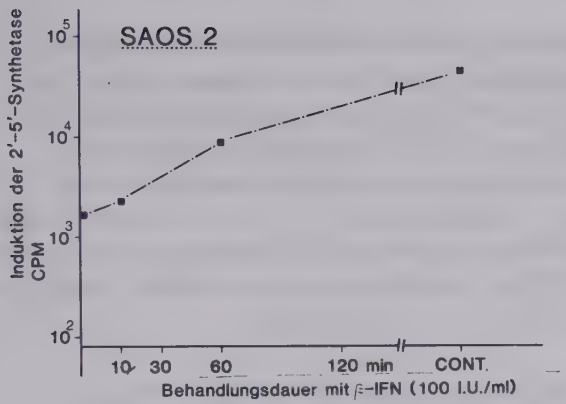
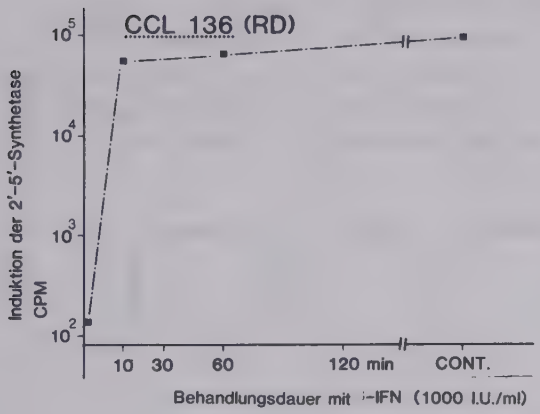
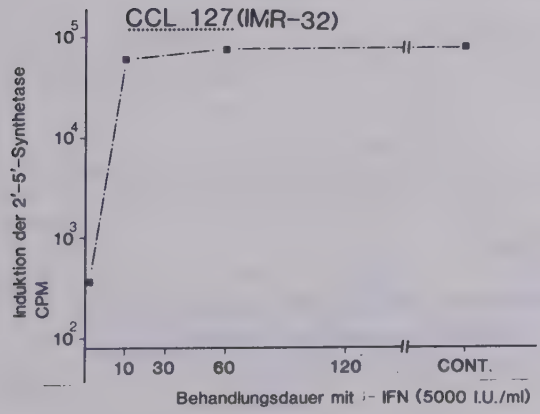



Abb. 15
oben

Induktion der
2' - 5' Synthetase
mit IFN - ß




mitte




unten

## 3.7. Antiproliferativer Effekt verschiedener Zytostatika

Die Zellen wurden bei der Monolayer Methode 24 Stunden lang der 10-fach niedrigeren und der höchsten therapeutisch in vivo im Serum nachzuweisenden Zytostatikakonzentration(Peak Konzentration, siehe Tab. Seite 94 ) ausgesetzt.
Bei der Agar Methode wurden die Zellen mit 10 mal, 1 mal und 1/10 mal Peak Konzentrationen für 1 Stunde inkubiert und danach im Agar ausgesät.

### 3.7.1. Ergebnisse bei der Osteogenen Sarkomlinie SAOS - 2

Die Zellen wurden Actinomycin D, Adriamycin, Methotrexat, Cis - platinum und VP - 16 ausgesetzt. Actinomycin D, Adriamycin, Methotrexat, Cis - platinum werden bei der z.Z. laufenden klinischen osteogenen Sarkomstudie COSS 80 eingesetzt. Die Abbildungen 16 und 17 zeigen die Ergebnisse.

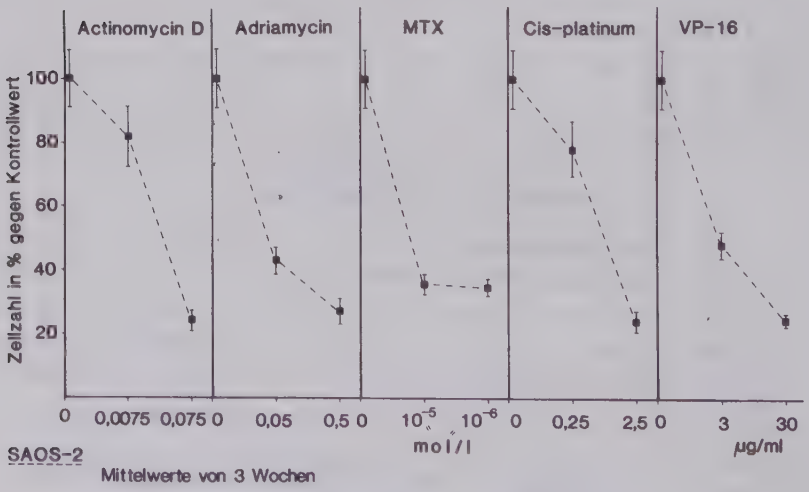



Abb. 16 Wachstum der SAOS - 2 Zellen nach 24 h Zytostatikaexposition in Abhängigkeit der Konzentration (Monolayerverfahren).

Mit zunehmender Zytostatikakonzentration zeigt sich bei beiden Methoden eine deutliche Wirkungssteigerung. Die Zellen sind gegenüber allen Zytostatika sensibel.

Bei der Monolayer Methode (24 h Exposition) ist die 1/10 "Peak" Konzentration wirksamer als bei der kolonienbildenden Methode (1 h Exposition).
Diese Konzentration wirkte im Agar bei Actinomycin D, Adriamycin und Cis - platinum eher stimulierend.

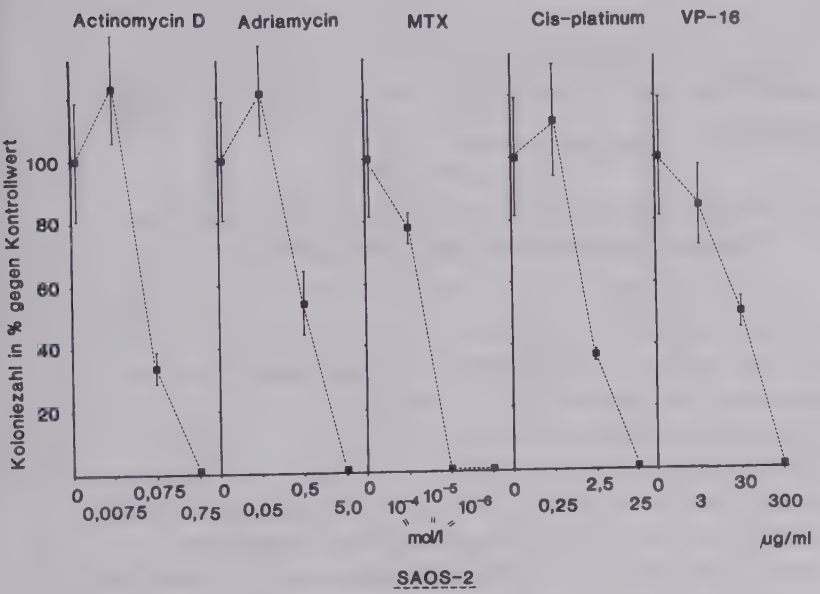



Abb. 17 Wachstum der SAOS - 2 Zellen nach 1 Stunde Zytostatikaexposition in Abhängigkeit von der Konzentration (Agarmethode J. Buck).

3.7.2. Ergebnisse bei der Rhabdomyosarkomlinie RD

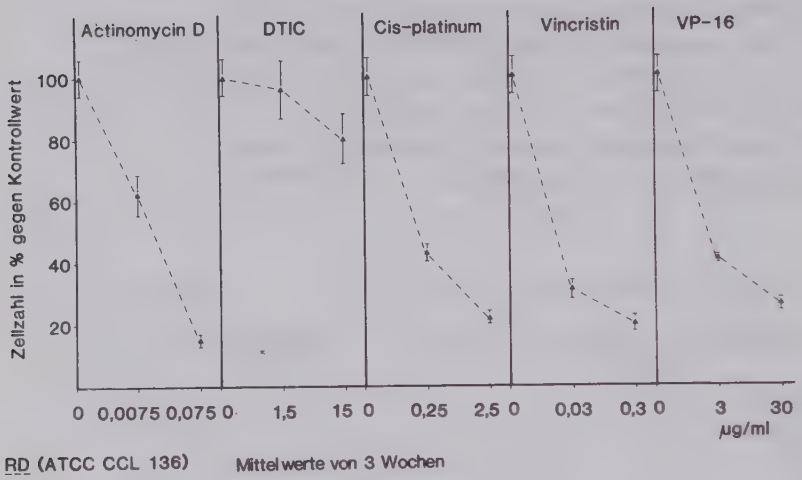



Abb. 18 Wachstum der RD - Zellen nach 24 h Zytostatika-exposition in Abhängigkeit der Konzentration (Monolayer).

Die Zellen wurden mit Actinomycin D, Cis - platinum, DTIC, Vincristin und VP - 16 behandelt. Bei der Behandlung der Rhabdomyosarkome werden u.a. Actinomycin D, Cis - platinum, DTIC und Vincristin eingesetzt.
Die Zellen sind bei beiden Methoden gegenüber Actinomycin D, Vincristin und VP - 16 viel sensibler als gegenüber DTIC. Cis - platinum wirkt bei der semisoliden Agarmethode schlecht, hingegen bei der Monolayer Methode gut. Diese Unwirksamkeit des Cis - platinum im Agar bei 2,5 µg/ml (Peak Konzentration) wurde jedoch wahrscheinlich durch einen systematischen Fehler verursacht; bei Wiederholung ergab sich ein Abfall der Koloniezahl auf 65 %.
Actinomycin D und Cis - platinum bei 1/10 Peak Konzentration senken die Koloniezahl im Agar nicht.

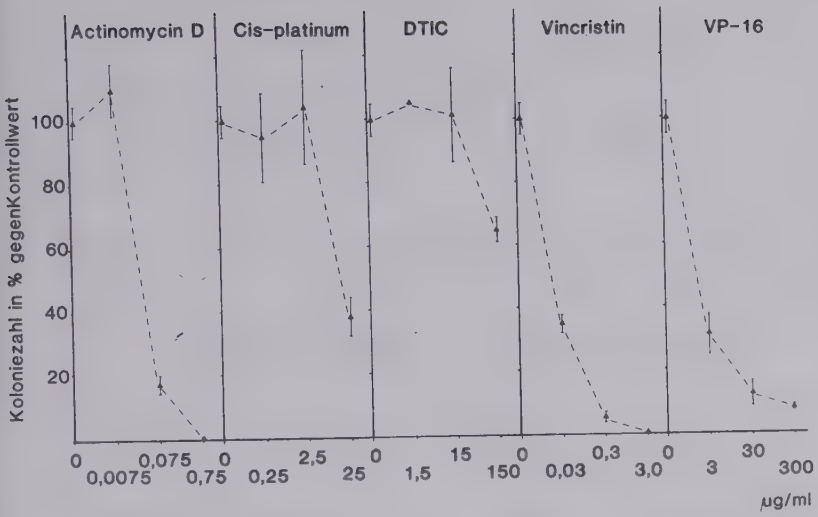



Abb. 19 Wachstum der RD - Zellen nach 1 h Zytostatikaexposition in Abhängigkeit der Konzentration (Agarmethode J. Buck).

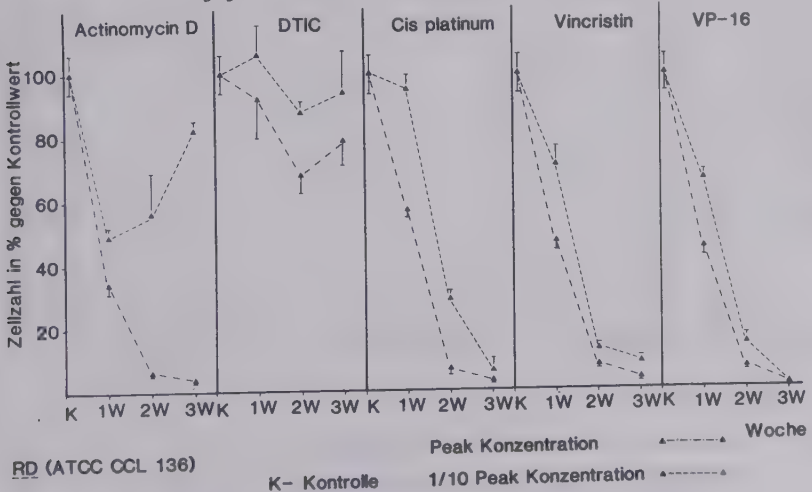



Abb. 20 Wachstum der RD - Zellen nach 24 h Zytostatikaexposition in Abhängigkeit der Konzentration (Monolayer Methode).

Abb. 20 zeigt das Verhalten der Rhabdomyosarkomzellen beim Monolayer Verfahren nach einmaliger 24 h Zytostatikaexposition im Verlauf von 3 Wochen.
Die Actinomycin D ausgesetzten Zellen erholen sich relativ zur Kontrolle nach der ersten Woche bei 1/10 x "Peak Konzentration" im Gegensatz zu 1 x "Peak Konzentration".
Die DTIC ausgesetzten Zellen erholen sich ab der 3. Woche sogar bei 1 x "Peak Konzentration".
Dieser Erholungseffekt tritt bei Cis - platinum, Vincristin und VP - 16 nicht auf.

### 3.7.3. Die Neuroblastomlinien SK - N - FI und IMR 32

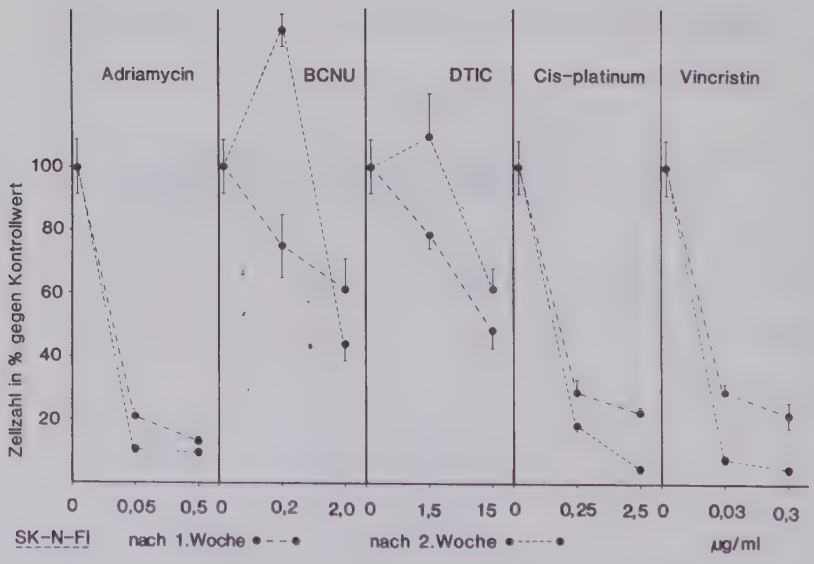



Abb. 21 Wachstum der Zellen nach 24 h Zytostatikaexposition in Abhängigkeit der Konzentration (Monolayer Methode).

Bei den Neuroblastomlinien wurden die Zytostatika Adriamycin, BCNU, Cis - platinum, DTIC, Vincristin und VP - 16 getestet. Adriamycin, DTIC und Vincristin werden klinisch in der z.Z. laufenden Neuroblastomstudie eingesetzt.
Bei beiden Zellinien ist die Monolayer Methode (24 h Exposition) empfindlicher.

1) SK - N - FI (Abb. 21 und 22)
   Bei beiden Methoden wurden hier dieselben Zytostatikakonzentrationsstufen (1 x und 1/10 x Peak Konzentration) angewendet. Adriamycin, Cis - platinum, Vincristin und VP - 16 (nur im Agar benutzt) sind hochwirksam.
   DTIC ist im Agar ohne Wirkung und bei der Monolayer Methode wie mit BCNU deutlich weniger wirksam als die anderen Zytostatika. Die Zellen erholen sich in der 2. Woche vom DTIC und BCNU bei 1/10 "Peak Konzentration" (Abb. 21).

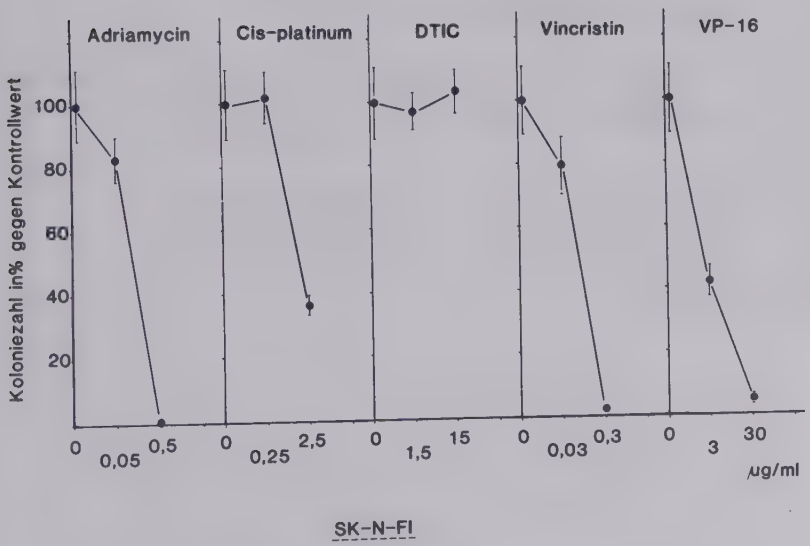



Abb. 22 Wachstum der Zellen nach 1 h Zytostatikaexposition in Abhängigkeit der Konzentration (Agar Methode J. Buck).

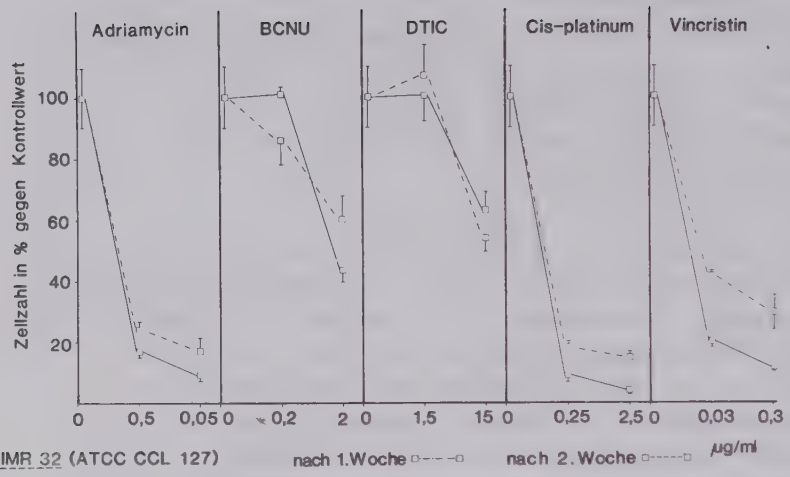



Abb. 23 Wachstum der Zellen bei der IMR 32 nach 24 h Zytostatikaexposition in Abhängigkeit der Konzentration (Monolayer Methode)

2) IMR - 32 (Abb. 23 und 24)

Die IMR - 32 Linie ist wie die SK - N - FI Linie empfindlich gegenüber Adriamycin, Cis - platinum und Vincristin.

DTIC und BCNU haben wieder einen deutlich geringeren Effekt. Beim Monolayer erholen sich die Neuroblastomzellen wieder in der 2. Woche vom BCNU bei der niedrigsten Konzentration.

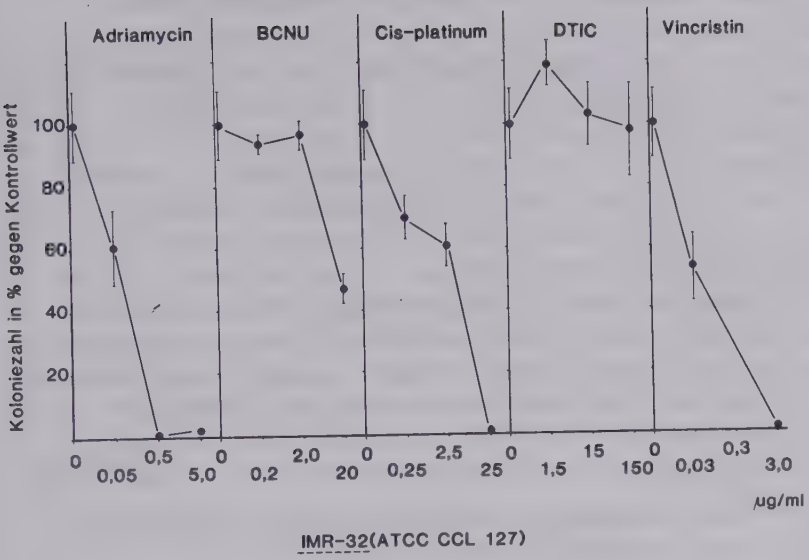



Abb. 24 Wachstumshemmung der Zellen bei der IMR - 32 nach 1 h Zytostatikaexposition in Abhängigkeit der Konzentration (Agar Methode J. Buck).

## 3.8. Ergebnisse der Kombinationsversuche

Bei diesen Versuchen wurden die Zellen entweder nur mit beta Interferon (Rentschler) oder nur mit Zytostatika oder in der Kombination eines Zytostatikums mit Interferon behandelt. Die Kontrolle erhielt nur die gleiche Menge HBSS anstatt der Testsubstanzen.
Den Ergebnissen mit der Monolayer Methode ist vorauszuschikken, daß ein Versuch 3 mal, d.h. nach der 1., 2. und 3. Woche ausgewertet wurde. Diese Wochenergebnisse sind in Abb. 33, 34 und 35 dargestellt.
Um die Daten der Monolayer Methode denen der Agar Technik gegenüberstellen zu können, wurden die Resultate der 3 Wochen addiert, durch 3 geteilt und wie bei der Agarmethode prozentual gegen die Kontrolle aufgetragen. Diese Durchschnittswerte sind in Abb. 27, 29 und 31 denen der Agarmethode in Abb. 28, 30 und 32 gegenübergestellt.

Die Kombinationsversuche wurden mit Hilfe eines statistischen Testes ausgewertet (siehe S. 17). Die Größe des dadurch ermittelten U - Wertes ordnet das Ergebnis der Kombination einer in der nachfolgenden Tabelle angegebenen Kategorie zu.

| U - Wert | Kategorie | |
|---|---|---|
| $U \geq + 2{,}58$ | Erwartungswert signifikant überschritten | Antagonismus mit $p < 0{,}01$ |
| $+2{,}58 > U > -2{,}58$<br>$U = 0$ | Ergebnis im additiven Bereich<br>= Erwartungswert | Additivität |
| $U \leq - 2{,}58$ | Erwartungswert signifikant unterschritten | Synergismus mit $p < 0{,}01$ |

Die Standardabweichungen sind weder in die Zeichnungen eingetragen, noch werden sie im Text erwähnt, da sie durch den statistischen Test in die U - Werte eingehen.

### 3.8.1. Kombinationsergebnisse nach 24 h Zytostatika-exposition bei der Monolayer Methode

In den ersten Kombinationsversuchen wurde mit der Monolayer Methode folgendes Behandlungsschema durchgeführt:
Nach einer Anwuchszeit von 24 h wurden die Zellen für 24 h den Zytostatika ausgesetzt und danach IFN bis zum nächsten Mediumwechsel (4 Tage) zugegeben.
Anschließend an die Auswertung nach der 1. und 2. Woche wurde erneut IFN zugesetzt.
In diesen Versuchen waren die meisten erreichten Reduktionen bei der Genauigkeit des Coulter Counter in diesem Bereich (siehe Fehlerbetrachtung S.20) zu hoch für eine sinnvolle Auswertung. Eine Ausnahme bildete DTIC und IFN bei der SK - N - FI und IMR - 32.

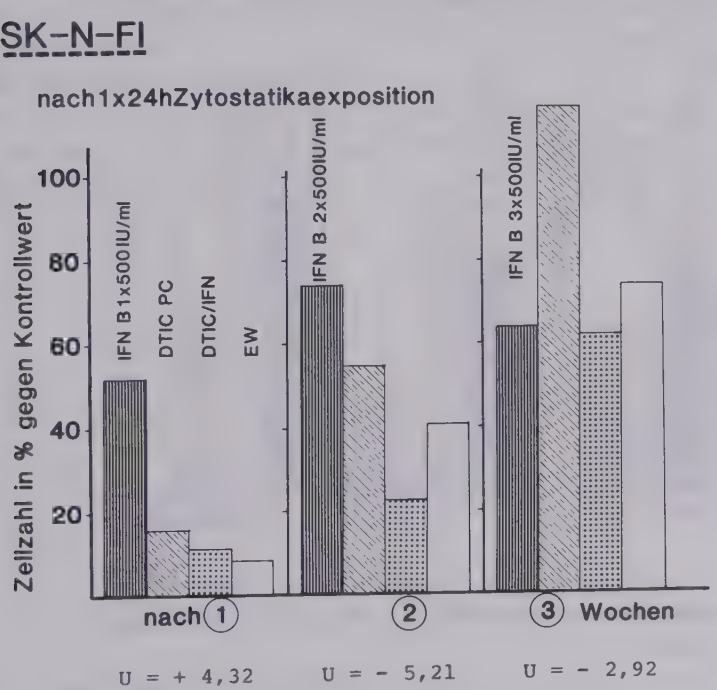
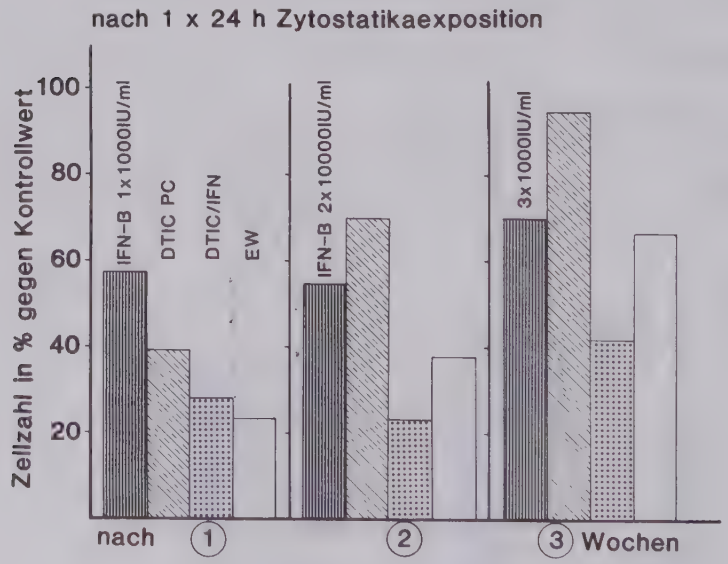



Abb. 25 Kombinationsergebnisse bei der SK - N - FI bei der Monolayer Methode

Der Erwartungswert (Abb. 25) wurde in der 1. Woche überschritten, in der 2. und 3. Woche war er signifikant synergistisch. Dies ergibt einen Durchschnitts - U - Wert von - 3,2. Die mit der Kombination erreichte Reduktion ist auch in der 1. Woche stärker als mit DTIC allein.
Die Signifikanz in der 1. Woche ist bedingt durch die extrem niedrige Standardabweichung von durchschnittlich 1,6 % gegenüber sonst 5 - 10 %.
Aus der Zeichnung ist deutlich die Erholung der Zellinie von der DTIC - Wirkung in der 2. Woche und in der 3. Woche mit die Kontrolle übersteigendem stimuliertem Wachstum zu erkennen.

## IMR 32 (CCL 127)




U = + 1,79 - 4,0 - 4,62

Abb. 26 Kombinationsergebnisse mit der IMR - 32 bei der Monolayer Methode

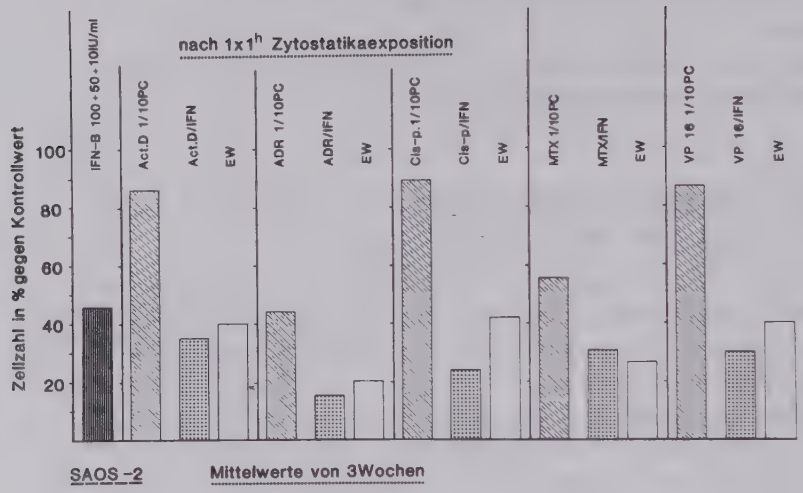
Der positive U - Wert nach der 1. Woche liegt im additiven Bereich, er ist nach der 2. und 3. Woche synergistisch.

Es ergibt sich ein durchschnittlicher U - Wert von 2,9.
Auch diese Neuroblastomlinie erholt sich von der DTIC - Wirkung.
Beide Neuroblastomlinien zeigen nach der Kombinationsbehandlung denselben Kurvenverlauf.

### 3.8.2. Kombinationsergebnisse nach 1 h Zytostatikaexposition bei beiden Methoden

Auf Grund der vorausgehenden Resultate wurden die weiteren Versuche der Monolayer Methode mit den gleichen Konzentrationen aber nur einstündiger (statt 24 h) Zytostatikaexposition wiederholt.
Bei der Agar Technik wurde die Zellsuspension ebenfalls für eine Stunde mit den Zytostatikas inkubiert, anschließend 2 mal gewaschen und IFN - ß für die gesamte Versuchsdauer dem Upperlayer zugesetzt.
Die Zytostatikakonzentration richtete sich nach den Vorversuchen (siehe 3.7.) und unterscheidet sich deshalb manchmal bei den Methoden.

SAOS - 2 :




| Acto D | ADR | Cis - p. | MTX | VP-16 |
|---|---|---|---|---|
| U = -1,9 | -3,2 | -6,2 | +2,0 | -3,7 |

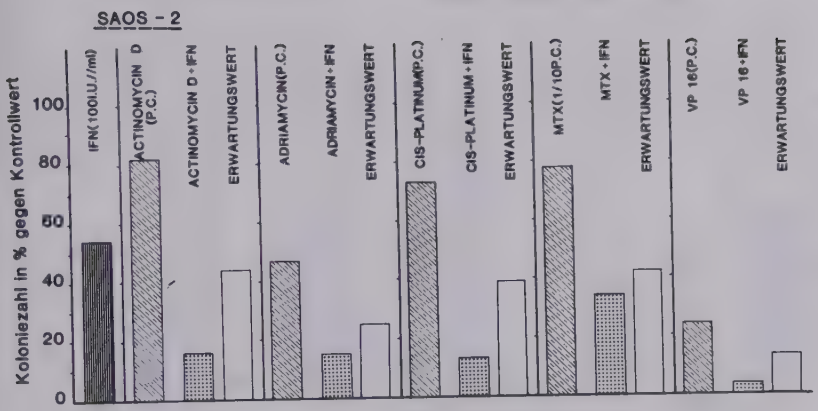
Abb. 27 SAOS - 2 Ergebnisse mit der Monolayer Methode

Um nicht durch Interferon allein zu niedrige, nicht mehr auswertbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Interferonbehandlung abgestuft.

Der U - Wertetabelle ist zu entnehmen, daß mit ADR, Cis-p. und VP - 16 signifikant synergistische Zellreduktionen erreicht wurden. Der U - Wert von Acto D war nicht signifikant, der von MTX und IFN sogar positiv (siehe hierzu Abb. 33).

Der mit der Kombination von MTX und IFN erreichte Wert ist dennoch niedriger als der kleinste Wert bei Einzelbehandlung.

SAOS - 2 :




| Acto D | ADR | Cis - p. | MTX | VP-16 |
|---|---|---|---|---|
| U = -6,7 | -3,5 | -7,0 | -1,9 | -7,7 |

Abb. 28 Ergebnisse mit der Agarmethode bei der SAOS - 2 (J. Buck)

Mit allen Zytostatika (Abb. 28), mit Ausnahme von MTX und IFN wurde der Erwartungswert signifikant unterschritten (Synergismus).

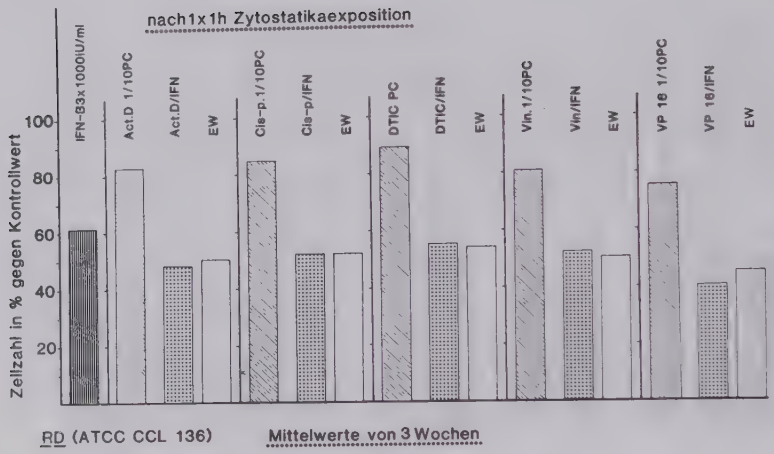
Vergleich der Ergebnisse bei der SAOS - 2

Mit beiden Methoden wurden in der Kombination von IFN mit ADR, Cis - p. oder VP 16 die Erwartungswerte signifikant unterboten, bei der Agarmethode auch mit Acto D.

Für MTX lagen die U - Werte bei beiden Methoden im additiven Bereich.

Die Kombination war immer wirksamer als die Einzelbehandlung, bezogen auf eine 3-wöchige Behandlungsdauer.

RD :

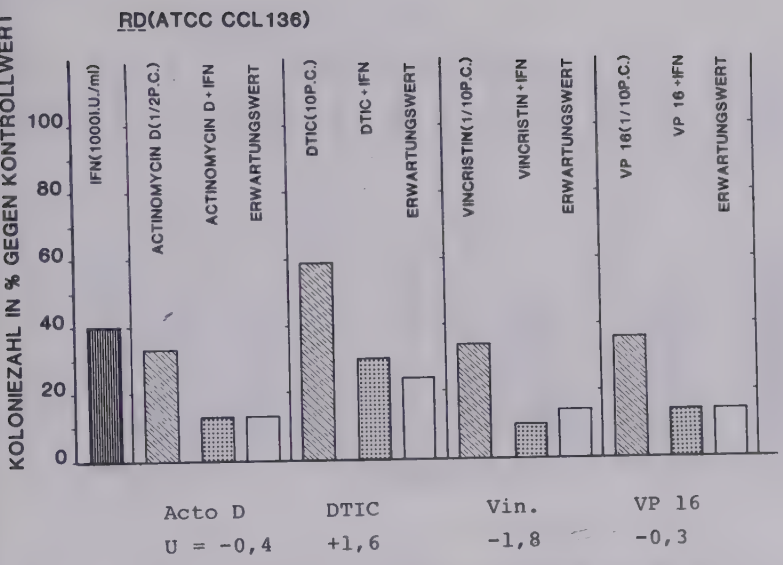



| Acto D | Cis - p. | DTIC | Vin. | VP 16 |
|---|---|---|---|---|
| U = -1,6 | -0,3 | +0,5 | +0,6 | -2,3 |

Abb. 29 Kombinationsergebnisse der RD Linie mit der Monolayer Methode

Alle Ergebnisse mit der Monolayer Methode bei der RD - Linie (Abb. 29) lagen im additiven Bereich.
DTIC und Vincristin in der Kombination mit IFN führten zu positiven U - Werten, VP 16 und IFN zu den höchsten negativen U - Werten und damit zum größten Abstand zur jeweiligen Einzelbehandlung mit den Substanzen.

RD :




| Acto D | DTIC | Vin. | VP 16 |
|---|---|---|---|
| U = -0,4 | +1,6 | -1,8 | -0,3 |

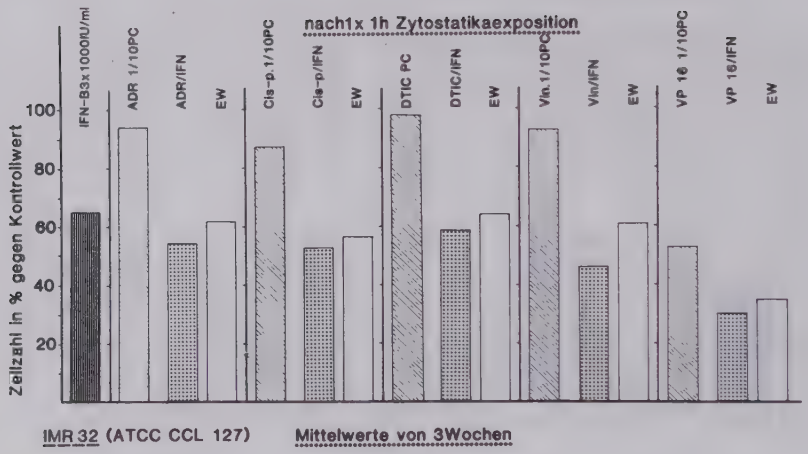
Abb. 30 Kombinationsergebnisse mit der Agarmethode bei der RD Linie

Die Kombinationsergebnisse mit der Agarmethode bei der RD - Linie (Abb. 30) lagen im additiven Bereich.
Der U - Wert von DTIC war positiv, der von Vincristin war der negativste aller Kombinationen.

Vergleich der Methoden bei der RD

Mit beiden Methoden lagen die U - Werte im additiven Bereich und waren für DTIC positiv.
Die Kombinationsbehandlung war immer wirksamer als die Einzelbehandlung.

IMR - 32 :



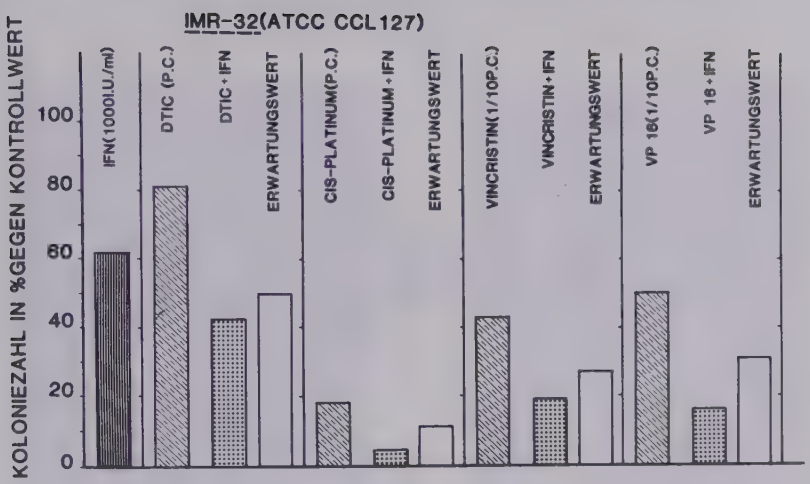

| ADR | Cis - p. | DTIC | Vin. | VP 16 |
|---|---|---|---|---|
| U = -2,0 | -1,4 | -1,8 | -2,4 | -2,3 |

Abb. 31 Kombinationsergebnisse mit der Monolayer Methode bei der IMR - 32

Die U - Werte für die Kombinationen in Abb. 31 sind nicht signifikant oberhalb oder unterhalb des additiven Bereichs. Alle U - Werte sind negativ und haben die Erwartungswerte erreicht.

Der U - Wert von DTIC ist hier nicht mehr synergistisch wie bei 24 h Exposition mit dem Zytostatikum in Abb. 26.

IMR - 32 :




| | DTIC | Cis-p. | Vin. | VP 16 |
|---|---|---|---|---|
| U = | - 2,3 | - 4,6 | - 2,6 | - 5,6 |

Abb. 32 Kombinationsergebnisse mit der Agar Methode bei der IMR 32
( J. Buck )

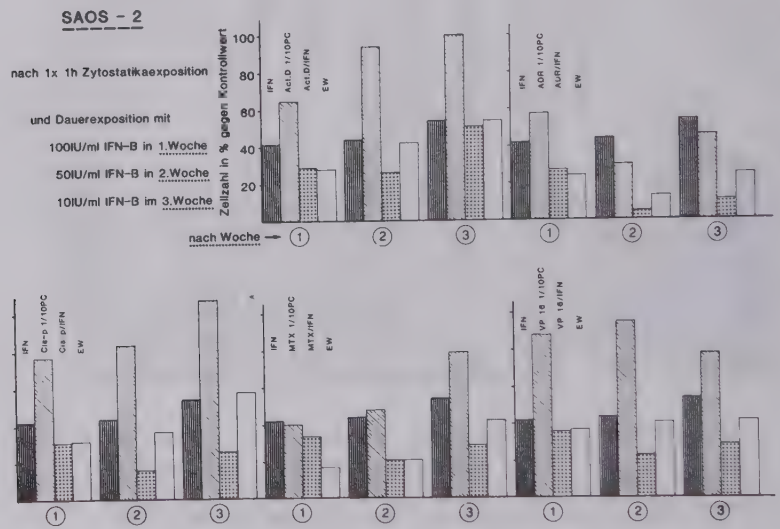
Die Kombination von IFN mit Cis-p.,Vin. oder VP 16 unterschreitet die U-Werte signifikant, der U-Wert von DTIC und IFN ist nicht mehr signifikant.

Vergleich der Methoden bei der IMR 32

Die U-Werte von Cis-p. und VP 16 sind bei der Agar Methode wesentlich niedriger. Alle U-Werte deuten aber bei beiden Methoden in die gleiche Richtung einer mindestens additiven Wirkung der Kombination, wobei zu bemerken ist, daß die Kombination Cis-p. und IFN in der Agar Methode mit Peak Konzentration und in der Monolayer Methode mit 1/10 P.C. durchgeführt wurde.

### 3.8.3. Kombinationsergebnisse der Monolayer Methode mit Darstellung der einzelnen Wochenergebnisse

#### 3.8.3.1. Wochenergebnisse der SAOS - 2 mit der Monolayer Methode



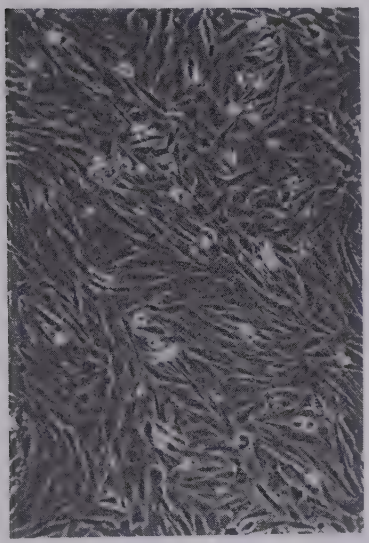

| | Acto D | ADR | Cis - p. | MTX | VP 16 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. Woche | U = +0,2 | +1,8 | -1,8 | +9,0 | -0,2 |
| 2. Woche | U = -5,0 | -4,7 | -7,8 | -0,2 | -6,0 |
| 3. Woche | U = -0,7 | -4,6 | -5,8 | -1,0 | -2,9 |

Abb. 33 Wochenergebnisse mit der Monolayer Methode bei der SAOS - 2

Diese Darstellung erlaubt einen Einblick in die Dynamik der Kombinationswirkung.
In der 2. und 3. Woche wurden mit ADR/IFN, Cis-p./IFN oder VP 16/IFN die Erwartungswerte signifikant unterschritten. Mit diesen Zytostatika ergaben sich auch in den Mittelwerten über 3 Wochen (Abb. 27) ein Synergismus. Mit MTX und IFN wurde in der 1. Woche ein noch signifikant antagonistischer U-Wert gemessen, der den positiven U-Mittelwert bestimmte. Der U-Wert der 2.Woche ist mit U=-0,2 negativ und nach der 3.Woche mit U=-1,0 deutlich negativ. Die Kombinationswirkung aller kombinierten Sustanzen ist in der 2.und 3.Woche stärker als in der 1..Die Zellen erholen sich von der reinen Zytostatikawirkung bei ActoD, Cis-p. und MTX bis zur 3.Woche.

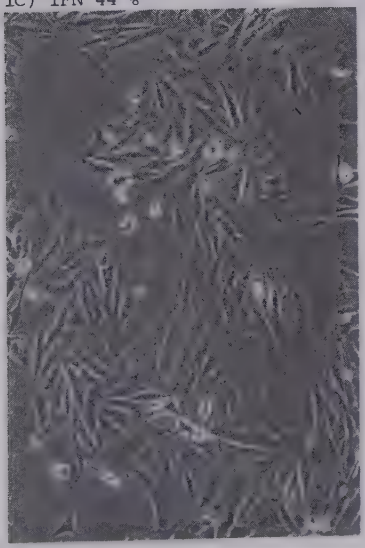
In Photo 1a - d sind die Ergebnisse von Acto D, IFN und Acto D/IFN nach der 2. Woche bei der SAOS - 2 photomikroskopisch dargestellt. Vergrößerung 100 mal Monolayer.

1a) Kontrolle 100 %



1b) Acto D 94 %

1c) IFN 44 %



1d) Acto D + IFN 27 %

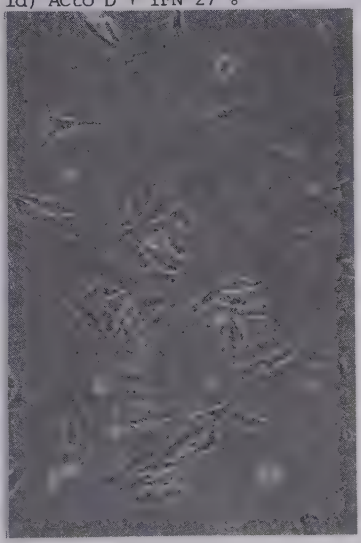
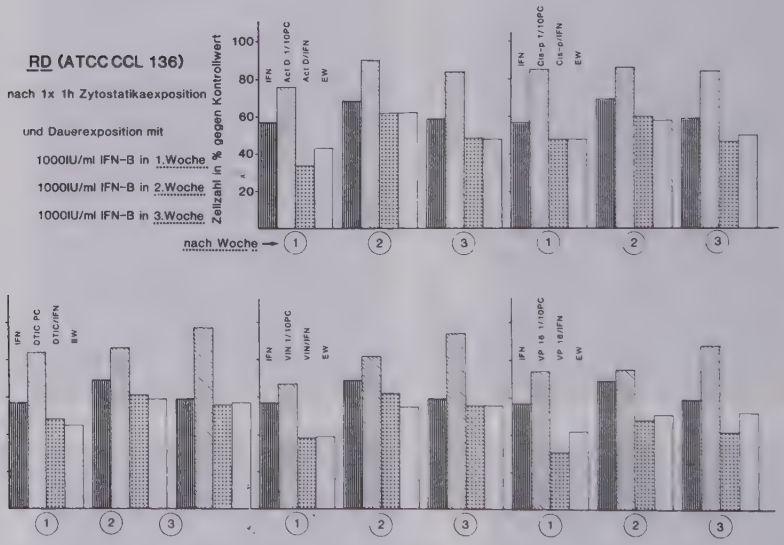


Photo 1 veranschaulicht die Kombinationswirkung bei Synergismus der Medikamente, hier Acto D und IFN bei der SAOS-2. U = -5,0
Man erkennt die deutlich geringere Zellzahl nach Gabe beider Medikamente in Photo 5d.

3.8.3.2. Wochenergebnisse der RD - Linie mit der Monolayer Methode



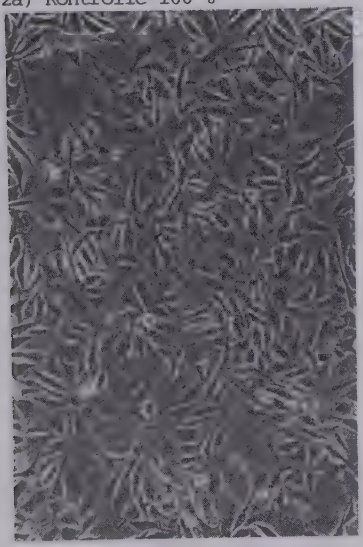

| | ActoD | Cis-p. | DTIC | VCR. | VP 16 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. Woche | U = - 4,8 | - 0,2 | + 1,5 | + 0,1 | - 4,0 |
| 2. Woche | U = - 0,1 | + 0,1 | + 0,4 | + 1,5 | - 0,9 |
| 3. Woche | U = - 1,3 | - 0,9 | - 0,4 | + 0,03 | - 2,0 |

Abb. 34 zeigt die Einzelwerte der RD Linie mit der Monolayer Methode

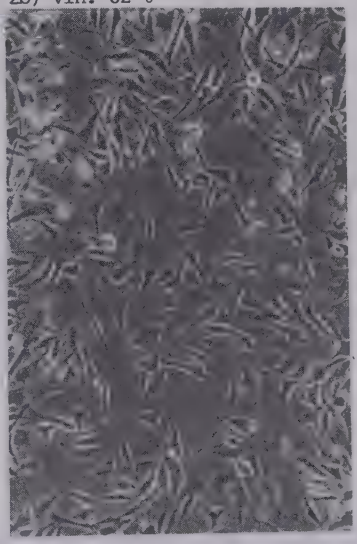
Die Kombinationswerte von Cis-p., DTIC und VCR. liegen um den Erwartungswert. Nur in der ersten Woche ergab sich für ActoD mit IFN und VP 16 mit IFN ein Synergismus.
Der Kombinationseffekt aller kombinierten Medikamente ist in der ersten Woche am ausgeprägtesten. Die Zellen erholen sich von der alleinigen Wirkung des Vincristins, DTIC und VP 16.

Photo 2 : Photomikroskopisches Ergebnis der RD - Linie mit VCR., IFN und VCR./IFN nach der 2. Woche beim Monolayer , Vergrößerung 100 mal

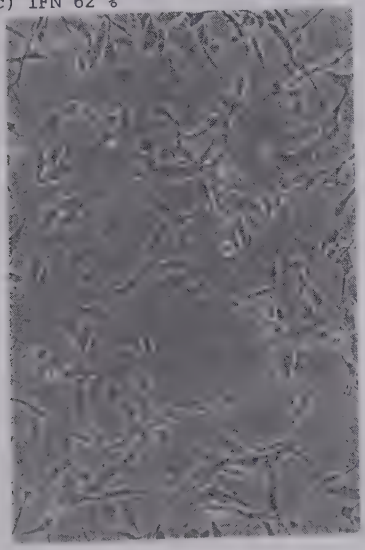
2a) Kontrolle 100 %



2b) Vin. 82 %



2c) IFN 62 %



2d) Vin. + IFN 56 % U = -1,5

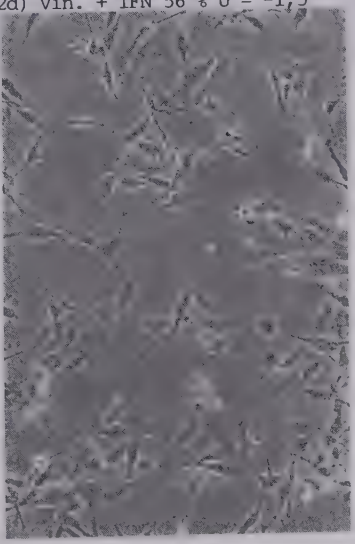
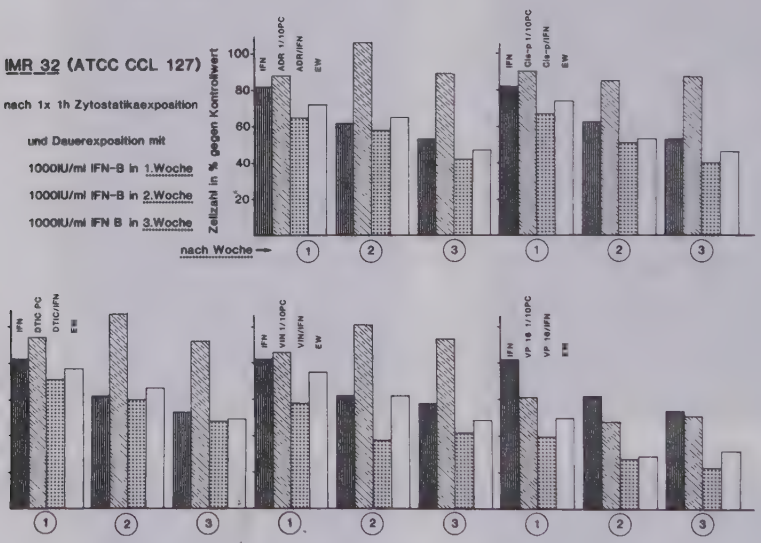


Photo 2 veranschaulicht im Gegensatz zu Photo 1 einen etwas weniger als additiven Effekt der Kombination VCR/IFN bei der RD - Linie. U = +1,5.
Nach Gabe beider Medikamente reduziert sich die Zellzahl nur noch geringfügig (Photo 2d).

3.8.3.3. Wochenergebnisse der IMR 32 bei der Monolayer Methode




| | ADR | Cis-p. | DTIC | Vin. | VP 16 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1.Woche U = | -2,3 | -2,1 | -2,3 | -4,3 | -2,9 |
| 2.Woche U = | -2,5 | -0,4 | -2,7 | -12,0 | -1,6 |
| 3.Woche U = | -1,2 | -1,7 | -0,3 | -1,7 | -2,1 |

Abb. 35 Wochenergebnisse der IMR 32 mit der Monolayer Methode

Die U-Werte (Abb. 35) von VCR./IFN und VP16/IFN sind in der ersten,die von DTIC/IFN und VCR./IFN in der 2. Woche synergistisch. Alle anderen U-Werte liegen im additiven Bereich. Die IMR 32 wurde auch 24 h dem DTIC ausgesetzt (3.8.1.). Dort ergab sich im Mittel ein Synergismus mit schwächster Wirkung in der 1.Woche. Jetzt konnte mit 1 h DTIC Exposition nur in der 2.Woche ein Synergismus gemessen werden und eine schwache additive Wirkung in der 3.Woche.

### 3.8.4. Zusammenfassung der Kombinationsergebnisse

Es kann festgehalten werden, daß mit beiden Methoden bei allen Zellinien, außer bei MTX und IFN mit der Monolayer Methode in der ersten Woche, der Erwartungswert nicht signifikant unterschritten wurde, d.h. ein Antagonismus nicht beobachtet werden konnte.

Tabellarische Übersicht der Kombinationsergebnisse:

| Linie | Meth. | ActoD | ADR | Cisp. | DTIC | MTX | Vin | VP 16 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SAOS-2 | Mono | NS | S | S | | NS | | S |
| | Agar | S | S | S | | NS | | S |
| RD | Mono | NS | | NS | NS | | NS | NS |
| | Agar | NS | | | NS | | NS | NS |
| IMR 32 | Mono | | NS | NS | NS | | NS | NS |
| | Agar | | | S | NS | | S | S |

NS = additiv
S = synergistisch

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, wurden mit MTX/IFN und DTIC/IFN unabhängig von der Zellinie die geringsten Kombinationseffekte erzielt. Mit Cis-p/IFN, ADR/IFN und VP 16/IFN wurden die stärksten Zellreduktionen erreicht, schwächer wirksam war die Kombination ActoD/IFN und VCR/IFN.

## IV. Diskussion

Die bisherigen Therapieerfolge mit Interferon als Monotherapie ergaben nur in Einzelfällen bessere Erfolge als mit heute üblichen zytostatischen Substanzen. Deshalb wird zur Zeit versucht, Interferon in die Zytostatikatherapie zu integrieren. Es gibt bis jetzt jedoch erst wenige in vitro Untersuchungen, aus denen Hinweise für die kombinierte Wirkung von Interferon und Zytostatika entnommen werden können.

Deshalb war die Hauptfragestellung dieser Arbeit die Prüfung des Wachstumsverhaltens menschlicher Tumorzellen, die mit Interferon und Zytostatika behandelt werden (4.8.).

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf in vivo Verhältnisse ist begrenzt; das Für und Wider wird in Kapitel 4.1. diskutiert. Ein Vergleich der beiden Methoden (4.2.) schließt sich an.

Bei der Vorbereitung und Durchführung der Kombinationsversuche ergaben sich zusätzliche Fragestellungen: Mockeffekt (4.4.), Interferonvergleich (4.5.), Zeitversuche (4.6.) und reine Zytostatikaversuche (4.7.).

## 4.1. Vergleich : in vitro - in vivo

In diesem Teil soll versucht werden, Unterschiede von in vitro Versuchen und in vivo Bedingungen deutlich zu machen. Vereinfachend sind die Unterschiede tabellarisch aufgeführt:

1) Bei in vitro Untersuchungen fehlt das Immunsystem und damit die mögliche Interaktion der Medikamente, des Tumors und des Wirts. (Dies gilt weitgehend auch für Versuche mit "Nude Mice") (84).

2) Die Interaktion der Zellen ist bei einer Einzelzellsuspension verändert (85). Mögliche Reparaturmechanismen nach Medikamentengabe sind ohne den Wirt eventuell vermindert (40).

3) Die in vitro wachsenden Tumorzellen wachsen meist schneller und teilen sich öfter als in vivo. Es handelt sich meist um rasch proliferierende, anaplastische Tumore (85).

4) Durch diese Zellkinetik und das häufige Passagieren ist die Züchtung von Subkulturen und immer anaplastischeren Inzuchtstämmen möglich. Die Zellen können sich schließlich in manchen Eigenschaften vom ursprünglichen Tumor unterscheiden und dadurch die Übertragbarkeit der Ergebnisse in Frage stellen.

5) Durch direkte Manipulation der Zellen, pipettieren, trypsinieren etc., können sich Membran- und Zellschäden ergeben, die Zellen sind dann vorgeschädigt (15, 40).

6) Die Zellen können durch MEM, humorale und andere Faktoren verändert werden (40).

7) Die Empfindlichkeit der Zellen ist teilweise von der verwendeten Zellkulturmethode abhängig (57).

8) Die Korrelation der Medikamentenkonzentration von in vitro zu in vivo ist noch nicht vollständig geklärt (31); TREUNER et al. haben in vivo Interferonspiegel gemessen von maximal 324 IU/ml IFN - ß bei einer injizierten Dosis von $9,6 \times 10^6$ IU/$m^2$ (108). SALMON (86) wies nach, daß ein Tumor, dessen Zellen in vitro auf 1/10 Peak Konzentration eines Zytostatikums sensibel reagieren, in vivo auf die

Peak Konzentration des Zytostatikums anspricht.
In dieser Arbeit wurden bei den meisten Zytostatika die 1/10 Peak Konzentration benutzt.

9) In vitro gegen IFN resistente $L_{1210}$ Zellen waren in anschließenden in vivo Versuchen mit Mäusen nicht mehr resistent (92). Das Immunsystem wird bei in vitro Versuchen nicht berücksichtigt.

Die zweite Tabelle zeigt Folgerungen aus Untersuchungen, die sich mit der Übertragbarkeit von in vitro erzielten Ergebnissen auf in vivo beschäftigten:

1) Nach ROCKWELL sind in vitro Untersuchungen ein exzellentes Modell, wenn nur einzelne Faktoren untersucht werden (85). In dieser Arbeit wurde nur ein Faktor, die direkte Zellvermehrungshemmung, gemessen.

2) BROWN behauptet, die in vitro Ergebnisse seien zwar nicht direkt übertragbar, aber die ihnen zugrunde liegenden Mechanismen (20).

3) Mit in vitro Tests wurde die unterschiedliche Chemosensitivität von Patienten mit morphologisch ähnlichen Tumoren nachgewiesen (31).

4) Gegen Zytostatika in vitro resistente Tumoren waren auch in vivo resistent (31).

5) Es besteht eine positive Korrelation der Überlebenszeit von Patienten mit ihren in vitro Testergebnissen(31,93,111).

In den Versuchen dieser Arbeit wurden bei den einzelnen Zellinien und Medikamenten sich unterscheidende Ergebnisse erzielt, die mit denen der Agar Methode (J. Buck) und denen anderer Untersucher (32,56,101) weitgehend übereinstimmen. Unter Berücksichtigung von vergleichenden in vitro - in vivo Untersuchungen kann man mit Vorbehalten annehmen,daß die erzielten Ergebnisse (10,31) in vivo gelten.

Auf die Problematik der Übertragbarkeit wird näher in den einzelnen Kapiteln eingegangen.

## 4.2. Methodenvergleich

### 4.2.1. Monolayer - Methode

Zu Versuchsbeginn wurde eine bestimmte Zahl von Zellen (100 000 Zellen/Loch) ausgesät, die dann als Monolayer auf dem Plastikboden wuchsen. Die Tumorzellen befanden sich, wie die entsprechenden Wachstumskurven zeigen(s.3.1.), während der Dauer des gesamten Versuchs in der log - Phase, d.h. die Zellzahl wuchs exponentiell an. Dieses exponentielle Wachstum war Bedingung für die Auswertung der Versuche.

Exponentielles Wachstum bedeutet jedoch nicht, daß jede einzelne Zelle sich teilt. Die Wachstumskurve verläuft auch dann exponentiell, wenn der Anteil der sich teilenden Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl gleich bleibt.
Die Zellen unterscheiden sich in der Steigung der Wachstumsgeraden, das heißt der Zellverdopplungszeit.

Bei der Monolayer Methode werden im Gegensatz zu koloniebildenden Agar Technik alle Zellen gezählt, die zum Auswertungstermin fest auf dem Plastik haften, also alle nur mit Trypsinierung abwaschbaren Zellen.

Durch die wöchentliche Auswertung lassen sich zeitliche Einflüsse von Medikamenten studieren ( siehe 3.5, 3.6, 3.8).

Während des drei oder mehr Wochen laufenden Versuchs ist die Kombination und Konzentration abänderbar.

Dieser Assay eignet sich nur für etablierte Zellinien.
Bei Versuchen mit Primärtumoren überwuchern die darin enthaltenen Fibroblasten die Tumorzellen.

### 4.2.2. Darstellung der in der Paralelluntersuchung verwendeten kolonienbildenden Agarmethode

Mit dieser Methode können außer etablierten Zellinien auch Primärtumore ausgetestet werden. Im Agar wachsen und teilen sich nur maligne Zellen, jedoch keine Fibroblasten.

Die Zellen werden als Einzelzellsuspension ausgesät, daraus bilden sich Cluster und Kolonien.
Die Ausbeute an Kolonien war unter sonst gleichen Wachstumsbedingungen direkt proportional der Zahl der ausgesäten Zellen. Weiter war die Kolonienausbeute von der intrinsischen "cloning efficiency" der jeweiligen Zellinie und von der Qualität des FKS abhängig.

Obwohl alle ausgesäten Zellen lebten ( Trypanblaufärbung ) bildeten nicht alle Kolonien. Auch mit dem besten FKS betrug die Kolonienausbeute nur 6 % der ausgesäten Zellen. Man definierte, daß eine Kolonie aus mehr als 100 Zellen besteht. Daher wurde nur eine solche Einzelzelle zur Kolonie, die sich öfters als als 6 mal teilte.
Nach SALMON werden mit diesem Assay die sogenannten " Stammzellen" gemessen ( 86 ).
Die Stammzelltheorie (32) postuliert, daß das Wachstum von Tumoren dem physiologischen Wachstum bestimmter Gewebe entspricht ( Knochenmark, Gastrointestinaltrakt, Epidermis ). Nur ein kleiner Teil von relativ undifferenzierten Zellen, die Stammzellen, soll die Fähigkeit unbegrenzter Teilungsfähigkeit besitzen, Die Mehrzahl der Gewebszellen, und zwar diejenigen, die morphologisch und funktionell die Spezifität des jeweiligen Gewebes ausmachen, soll differenzierter sein und damit die Teilungsfähigkeit verloren haben.
Tumoren sollen von einzelnen Stammzellen abstammen, die der normalen Restriktion und Kontrolle des Wachstums entronnen sind. Die Stammzellen erzeugen dann die Masse der weiter differenzierteren Tumorzellen. Bei Ausschwemmung sind die Stammzellen wahrscheinlich die Zellen, die Metastasen bilden.

Die Tumortherapie muß also vor allem auf die Ausrottung dieser Stammzellen zielen.
Die großen Kolonien enthalten im Gegensatz zu den Clustern Zellen, die sich weiter unbegrenzt teilen können und somit die postulierten Stammzelleigenschaften besitzen. Dieser Assay mißt quantitativ die Interaktion zwischen Medikament und Stammzellen.

Im Gegensatz zur Monolayer Methode ist im Agar nach dem Ausäen eine erneute medikamentöse Manipulation der Zellen nur begrenzt möglich.

### 4.2.3. Vergleich der beiden Methoden

Obwohl mit beiden Methoden verschiedene Parameter des Tumorwachstums ( Gesamtzahl aller Zellen contra Anzahl an Kolonien ) gemessen werden, zeigen die Ergebnisse in dieselbe Richtung und liegen quantitativ in derselben Grössenordnung. Die Resultate werden im einzelnen in den folgenden Kapiteln diskutiert und verglichen.

Die Tabelle auf der nächsten Seite zeigt verschiedene Aspekte der beiden Methoden im Vergleich.

Für Kombinationsversuche bei denen die Reihenfolge bzw. die Expositionsdauer der Medikamente variert werden soll, wäre es sinnvoll, die beiden Methoden zu kombinieren, die Zellen also zuerst im Monolayer mit verschiedenen Medikamenten zu behandeln und danach im Agar auszusäen.

| Monolayer Methode | Kolonienbildende Agarmethode |
|---|---|
| ANSATZ mit | |
| etablierten Zellinien | etablierten Zellinien und Primärtumoren (Prüfung der in vivo Sensibilität gegen Zytostatika in vitro möglich) |
| EXPOSITION mit MEDIKAMENTEN | |
| während Versuch Konzentration änderbar, anderes Medikament zufügbar | nach Aussaat im Agar kaum weitere medikamentöse Manipulation der Zellen möglich |
| Medikament kommt ("physiologisch) erst auf Zellen,die bereits einen Tag angewachsen sind | Zeitexposition: frisch trypsinierte Monolayerzellen kommen in Suspension für best. Zeit mit Medikament in Kontakt, werden danach ausgesät |
| AUSWERTUNG | |
| alle Zellen werden gezählt | Kolonien werden gezählt,die aus "Stammzellen"entstanden |
| Zellzahlbestimmung durch Coulter Counter oder Fuchs - Rosenthal - Zählkammer | Koloniezahlbestimmung durch Auszählung durchs Phasenkontrastmikroskop |
| zeitliche Verlaufstudien durch wöchentliche Auswertung | ohne Zählcomputer zeitliche Auswertung nicht möglich |

## 4.3. Antiproliferativer Effekt des Interferon

Seit den Versuchen von PAUCKER, CANTELL und HENLE (80) ist bekannt, daß Interferon das Wachstum von Zellkulturen hemmen kann und zwar sowohl das Wachstum von Fibroblasten wie von malignen Zellen (9).
Dabei wirkt Interferon nicht direkt toxisch auf die Zellen (81,46). Auch bei diesen Versuchen konnte während oder nach der Exposition mit Interferon keine Lyse oder Degeneration der Zellen festgestellt werden. Die ausgewerteten Zellen zeigten lichtmikroskopisch weder abnorme Formen oder Kontraktionen, noch waren sie mit Trypanblau anfärbbar.

Die Zellen können sich von der antiproliferativen Wirkung des Interferon einige Zeit nach Wegfall der Interferonexposition erholen (siehe Abb. 12) (36,99). Nach den Versuchen von GRESSER (46) gilt diese Reversibilität jedoch nicht für alle Zellen der Population; bei längerer Behandlung mit Interferon soll ein Teil der Zellen verloren gehen. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig.Verschiedene Zellinien sind verschieden sensibel gegen Interferon (28, 60, 82),es gibt sowohl sehr sensible als auch gegen Interferon resistente Zellinien. BRADLEY (18) fand sogar Zellinien, deren Kolonieausbeute im semisoliden Agar durch Interferon erhöht wurde; in den Löchern mit Interferon bildeten sich mehr Kolonien als in den Kontrollöchern.

Von den Zellinien dieser Arbeit zeigte die SAOS - 2 Linie osteogenes Sarkom) schon bei 10 IU/ml IFN - ß, die IMR - 32 Zellinie (Neuroblastom) erst bei 1 000 IU/ml IFN - ß einen Abfall der Zell- bzw. Koloniezahl.
Verschiedene Zellinien der gleichen Tumorart können verschieden auf Interferon reagieren (18, 101). Von beiden Neuroblastomlinien zeigte die SK - N - FI einen Abfall bei 100 IU/ml, die IMR - 32 erst bei der zehnfachen Menge, nämlich 1 000 IU/ml.

Die verwendeten Zellinien wurden bereits von TREUNER et al. im Monolayer gegen IFN -$\alpha$ und IFN - ß ausgetestet (106). Die Ergebnisse liegen quantitativ in der gleichen Größenordnung, die Reihenfolge der Empfindlichkeit der verschiedenen Zellinien entspricht diesen Ergebnissen.

STRANDER (101) testete die SAOS - 2 Linie mit der Monolayer Methode gegen IFN -$\alpha$. Seine Ergebnisse entsprechen denen, die hier im Monolayer mit IFN - ß gemessen wurden.

Über den Mechanismus der IFN - induzierten Wachstumshemmung ist noch sehr wenig bekannt:
Nach BALKWILK (9) soll jede Phase des Zellzyklus proportional verlängert werden.
WANATABE (115) zieht aus Versuchen mit Fibroblasten den Schluß, daß Interferon die Zellen während der $G_1$ - Phase in ein Ruhestadium ($G_0$) überführt.

Bei DAHL (28) wurden schnellwachsende Zellinien stärker durch dieselbe Menge Interferon gehemmt als langsamwachsende. Dies war in diesen Versuchen nicht der Fall; die gegen Interferon relativ unempfindliche IMR - 32 Zellinie zeigt dieselbe Steigung in ihrer Wachstumskurve wie die sehr empfindliche SAOS - 2 Linie (siehe Abb.2 und 3).

## 4.4. Wachstumshemmende Wirkung der wärmeinaktivierten Mock - Präparation des Interferon - ß

GRESSER (49) und KNIGHT (64) wiesen 1973 mit hochgereinigtem Mäuse - Interferon nach, daß das Interferonmolekül selbst sowohl antiviral als auch antiproliferativ wirkt. Diese Eigenschaften wurden für das menschliche Interferonmolekül bestätigt (101).
In der Literatur gibt es verschiedene und sich widersprechende Angaben darüber, daß "Nicht - Interferon - Anteile" in Interferonpräparationen bei in vitro Versuchen eine antiproliferative Wirkung zeigten (siehe Einleitung).

ADAMS, STRANDER und CANTELL stellten 1975 (2) bei der gegenüber IFN -$\alpha$ hochsensiblen Daudi - Linie (Burkitt's Lymphom) mit einer Mock - Präparation bis zu $10^5$ U/ml keinen wachstumshemmenden Effekt fest.

1977 fanden STRANDER und EINHORN (101) mit 1 000 U/ml Mock - IFN -$\alpha$ bei 9 Osteosarkomzellinien einen leichten, variablen,jedoch nicht signifikanten wachstumshemmenden Effekt. Dieser Effekt war viel schwächer ausgeprägt als mit der entsprechenden Dosis des Interferon - Präparats.
HILFENHAUS (59, 60) bestätigte die Ergebnisse von ADAMS et al. (2) bei der Daudi Linie, die gegen Mock -$\alpha$ nicht sensibel ist. Er fand jedoch auch, daß die gegen IFN -$\alpha$ empfindliche P3HR 1- (Burkitt's Lymphom) und Diehl I - Linien (Ebstein Barr transformierte Lymphozyten) durch eine Mock Präparation, die 2 000 U/ml IFN -$\alpha$ entsprach, um 50 % in ihrem Wachstum gehemmt wurden.

In den obigen Arbeiten wurde mit Mock -$\alpha$ gearbeitet. Die verwendeten Mock - Präparationen wurden bei der Herstellung im Gegensatz zu richtigen Interferon - Präparationen nicht mit Virus induziert.

Über Mock - Präparate des IFN - ß gibt es Bericht von PFEFFER (82) und MAYER / EICHBERGER (36).
Bei PFEFFER zeigte das Mock bis 2560 U/ml keinen antiproliferativen Effekt. Er macht jedoch keine Angaben über die Herstellungsweise seiner Mock - Präparation.

MAYER / EICHBERGER arbeiteten auch mit der Mock - Präparation der Firma Rentschler, jedoch mit einer anderen Charge.
Bei der SAOS - 2 Zellinie bemerkten MAYER / EICHBERGER bei der $10^3$ IU/ml entsprechenden Menge Mock eine schwache, bei $10^4$IU/ml eine starke Reduktion der Zellzahl. Die antiproliferative Wirkung des Mock war schwächer als bei der entsprechenden Menge IFN - ß; $10^4$ IU/ml Mock entsprach in der Wirkung $10^3$ IU/ml IFN - ß.
Die MAYER / EICHBERGER'schen Ergebnisse konnten bestätigt werden.
In den Versuchen zeigte dieselbe Menge Mock sowohl bei der gegenüber Interferon sehr empfindlichen SAOS - 2 Linie als auch bei der unempfindlicheren IMR - 32 Zellinie den gleichstarken antiproliferativen Effekt in der Monolayer- und in der kolonienbildenden Methode (siehe 3.3.2.).
Dieser Effekt beginnt bei der 1 000 IU/ml entsprechenden Mockmenge und wird mit zunehmender Konzentration stärker.

Mock wirkt während 3 Wochen im Verhältnis zu einer unbehandelten Kontrolle jede Woche gleich stark wachstumshemmend. Beim Interferon nimmt der wachstumshemmende Effekt über die Wochen zu (siehe Abb. 7).

Es stellt sich die Frage, ob dieser Mock - Effekt bewirkt wird durch eine bei der Wärmeinaktivierung entstehende neue Substanz (Abbauprodukt) oder diese "nicht Interferon" bedingte antiproliferative Wirkung durch einen primär jeder Interferon - Präparation zugehörigen Faktor (z.B. Protein - Stabilisator) bedingt ist.

Mit Hilfe von humanem Serum, das Antikörper gegen IFN - ß enthält, versuchte J. Buck dieser Frage nachzugehen. Er benutzte eine Antikörperkonzentration,

die ausreicht, die 10-fache Menge des vorhandenen Interferons zu inaktivieren.
Bei 1000 IU²ml IFN - ß zusammen mit IFN - ß - Antikörpern ergab sich keine Aufhebung des antiproliferativen Effekts. Die SAOS - 2, als auch die IMR - 32 - Zellinie reagierten mit derselben Hemmung, wie dies mit 1 000 IU/ml Mock beobachtet worden war (siehe 3.3.2.).

Nach diesen Versuchen enthält die von Rentschler hergestellte IFN - ß - Präparation also eine antiproliferativ wirkende Nicht - IFN - ß - Komponente, die sich ab einer Konzentration von 1 000 IU/ml antiproliferativ auswirkt.

Klinisch ist dieser Effekt bei den zur Zeit verwendeten Interferon - Dosen nicht relevant.
TREUNER et al. beobachteten nach der i.v. - Applikation von IFN - ß bei Kindern 384 IU/ml als höchsten Serumspiegel bei einmaliger Dosis von 9,6 x $10^6$IU/$m^2$KO IFN - ß. Bei dieser Konzentration des Interferons im Serum spielt der antiproliferative Mock - Effekt keine Rolle.

## 4.5. Antiproliferative Wirkungsvergleiche von alpha, beta und gamma Interferonen

### 4.5.1. Vergleich von alpha und beta Interferon

Die antivirale und antiproliferative Wirkung von IFN -$\alpha$ (Leukozyteninterferon (101), Lymphoblasteninterferon (Namalva) (9, 91), IFN - ß (Rentschler (36), Knight (64) Interferon) und IFN -$\gamma$ (26) wurde in vielen in vitro Untersuchungen nachgeprüft und die antiproliferative Wirkung der verschiedenen Interferone, (bei gleicher antiviraler Aktivität (24, 37)) verglichen.

STRANDER (38) vermutete, daß die verschiedenen Interferone einen gewebsspezifischen Faktor besitzen.
In seinen Untersuchungen war IFN - ß bei zwei Osteosarkomlinien und IFN -$\alpha$ bei zwei Lymphoblastenlinien wirksamer.

HILFENHAUS (59) fand allerdings nur eine geringe Wirkungsdifferenz zwischen IFN -$\alpha$ und IFN - ß bei der von STRANDER getesteten Lymphoblastenlinie Daudi.

KUWATA (68) konnte mit IFN - ß immer eine stärkere Hemmung bei den Linien RSa und RSb messen und eine gegen IFN -$\alpha$ resistente Sublinie von RSa war gegen IFN - ß nur wenig resistent.

BRADLEY (18) testete eine Vielzahl von Tumoren, bei denen Lymphoblasten- und Leukozyteninterferon etwa die gleiche, aber eine geringere antiproliferative Aktivität als IFN-ß zeigten.

In den Untersuchungen von TREUNER et al. (106) war IFN - ß bei der SAOS - 2, RD und IMR - 32 ebenfalls wirksamer, in einzelnen Wochen sogar mehr als 10-fach.
Mit diesen Versuchen können diese Ergebnisse für die SAOS - 2 und IMR - 32 bestätigt werden.
IFN -$\alpha$ besaß eine bis zu 10-fach geringere Wachstumshemmung wie IFN - ß. IFN -$\alpha_2$ aus E.coli zeigte einen schwächeren Effekt als das aus Leukozyten bzw. aus

Lymphoblasten gewonnene IFN - $\alpha$ .
Von den beiden Fibroblasteninterferonen war das höher gereinigte IFN - ß (Knight) antiproliferativ wirksamer.

4.5.2. Vergleich von IFN - ß (Rentschler) mit IFN - $\gamma$ (Nielsen)

Die antiproliferative Wirkung des seit kurzer Zeit zur Verfügung stehenden IFN - $\gamma$ (Immuninterferon) wurde erst in wenigen in vitro Untersuchungen ausgetestet.
CRANE (26) fand in Versuchen mit weiblichen Mäusen mit osteogenem Sarkom, daß IFN - $\gamma$ 100-fach wirksamer sei als IFN - $\alpha$ .

BERISH (13) berichtete nach Versuchen mit Hela, SKOS und FS 4 Zellinien von einer 100-fach stärkeren Wirkung des IFN - $\gamma$ gegenüber IFN - ß.

BLALOCK (14) testete seine Linien Wish und HEp 2 mit IFN - $\alpha$ , IFN - ß und IFN - $\gamma$ . IFN - $\gamma$ war ca. 60 mal, IFN - ß 15 mal effektiver bezogen auf IFN - $\alpha$.

In diesen Versuchen konnte mit IFN - $\gamma$ ebenfalls eine stärkere Zellvermehrungshemmung gemessen werden als mit IFN - ß.
IFN - $\gamma$ war bei der SAOS - 2 wenig, bei der IMR 32 fast 10 mal wirksamer.
Auch mit der Agar Technik wurde bei der SAOS - 2 ein 4 mal, bei der IMR 32 ein 4o fach stärkerer Effekt erzielt.
Der stärker wachstumshemmende Effekt des IFN - $\gamma$ ist bei den gegen IFN - $\alpha$ und IFN - ß relativ resistenten IMR 32 Zellen ausgeprägter als bei den sensiblen SAOS - 2 Zellen.

Auf Grund der Untersuchungen von BERISH (13) bieten sich zwei Erklärungsmöglichkeiten an :
1) Die antivirale Aktivität gleichmolarer IFN - ß und IFN - $\gamma$ Lösungen war bei 4 untersuchten Virusarten verschieden. Die Replikation zweier Virusarten wurde

mehr durch die IFN - ß Lösung, die anderen mehr durch die IFN - $\gamma$ Lösung gehemmt.
Eventuell ist die Virusart mit der die I.U. des IFN's standardisiert werden empfindlicher gegen IFN - $\alpha$ und IFN - ß als gegen IFN - $\gamma$ . Damit wäre eine IFN - $\gamma$ Lösung gleicher antiviraler Aktivität höher molar.

2) Zweitens zeigte er, daß IFN - $\gamma$ bei menschlichen Fibroblasten Proteine mit einer wesentlich anderen Aminosäuresequenz induziert als IFN - $\alpha$ und IFN - ß.
Das würde für einen möglichen anderen Wirkungsmechanismus des IFN - $\gamma$ sprechen.
Die ausgeprägtere Wirkung des IFN - $\gamma$ bei der gegen IFN - $\alpha$ und IFN - ß relativ resistenten IMR 32 könnte durch folgende Beobachtungen ANKEL's (8) erklärt werden :
IFN - $\alpha$ und IFN - ß sollen im Gegensatz zu IFN - $\gamma$ durch erhöhte Gangliosidspiegel gehemmt werden.
Bei vielen Tumoren werden erhöhte Gangliosidspiegel gemessen (8).

## 4.6. Die Ausbildung der antiproliferativen Wirkung des Interferons in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit

Für den klinischen Einsatz von Interferon ist es bis heute noch ungeklärt, wie lange entsprechende Interferonspiegel im Plasma aufrecht erhalten werden müssen.
Versuche, die bisher mit Zellkulturen darüber gemacht wurden zeigen widersprüchliche Ergebnisse.
Nach 6 h und 12 h Exposition mit Interferon fand GRESSER (46) mit einer kolonienbildenden Methode in Agarose bei der Mäuseleukämiezellinie $L_{1210}$ nur einen schwach antiproliferativen Effekt, der bei der 24 h und vor allem der 48 h Exposition stärker wurde.
Humane Fibroblasten wurden bei PFEFFER (82) nach einer 1 h Exposition mit IFN - ß bereits gleich stark in ihrem Wachstum gehemmt wie mit 4-tägiger Dauerexposition.

BRADLEY (18) testete im semisoliden Agarsystem eine humane Myelomlinie und einen humanen Primärtumor (Ovarialkarzinom aus frischem Ascites) gegen 1 000 IU/ml IFN - ß aus.
Nach 1 h Exposition bekam er beides mal eine gleiche Reduktion der Koloniezahl wie mit Dauerexposition.

Mit der Monolayer Methode zeigte sich nach der 2 h Interferonexposition eine schwach antiproliferative Wirkung, die jedoch viel schwächer war als mit Dauerexposition.
Eventuell sind für die Ausbildung des antiviralen Status solange Interaktionszeiten nicht nötig. Mit hohen Interferondosen ( 1 000 IU/ml IFN - ß bei der RD Linie, 5 000 IU/ml IFN - ß bei der IMR 32 ) wurde die Aktivität der 2' - 5' Synthetase bereits nach 10 min Exposition stark erhöht.

Bei der SAOS - 2 Linie, die auf die antiproliferative Wirkung von IFN - ß besonders empfindlich reagiert, fand sich im Versuch mit der 2' - 5' Synthetase nach 10 min Exposition eine bereits 10-fach höhere Aktivität mit nur 100 IU IFN - ß als mit den anderen Linien. Demnach kann von der Aktivität der 2' - 5' Synthetase und damit der Empfindlichkeit gegenüber der antiviralen Wirkung, die Antiproliferative vermutet werden. Für die Aufrechterhaltung des wachstumsverminderden Effektes sind jedoch längere Kontaktzeiten ( 3.6.2. ) und eine mehrmalige Gabe notwendig ( 3.6.2.).

## 4.7. Expositionsversuche mit Zytostatika

Das Wissen über die Pharmakokinetik und die konkrete intrazelluläre biochemische Wirkung der einzelnen Zytostatika ist noch sehr lückenhaft. Die "Target - Theorie" ist die zur Zeit übliche Theorie zur Analyse der Zytostatikawirkung, da zu ihrer Anwendung kein biochemisches Vorwissen notwendig ist und sie trotzdem eine quantitative Auswertung der Ergebnisse ermöglicht. Damit soll die Interaktion von Zelle und Medikament und zwischen zwei Medikamenten bei den Kombinationsversuchen erklärt werden (siehe 4.8.).

Die Target Theorie wurde 1955 von LEA (69) zur Erklärung der Wirkung von Bestrahlung auf Zellen entwickelt und von DREWINKO (34) so modifiziert, daß sie auf Zytostatika anwendbar ist.

Die Zelle wird als "black box" verstanden, von deren Innenleben nichts bekannt ist. Es wird in der Zelle eine diskrete Zahl sich unterscheidender Strukturen und Prozesse postuliert (=Targets). Diese Targets sind an den zellulären Aktivitäten beteiligt, die für die Reproduktion der Zelle notwendig sind. Sie entsprechen essentiellen Makromolekülen bzw. kritischen biosynthetischen Reaktionsketten.

Nach der Theorie muß eine fixe, kritische Zahl solcher Targets inaktiviert werden, damit sich die Zelle nicht mehr teilen kann, bzw. lethal geschädigt wird.

Werden mehr Targets getroffen, entspricht das einem "Overkill" der Zelle.

Wenn weniger Targets als die kritische Zahl getroffen werden, führt das nicht zum reproduktiven Tod der Zelle, sondern zu ihrer sublethalen Schädigung. Diese Schädigung kann von außen gar nicht bemerkbar sein; sie kann aber auch zur Verlangsamung des Zellzyklus führen.

Der in den Versuchen nach Zytostatikaexposition gemessene Abfall der Zell- bzw. Koloniezahl sagt wenig über das Verhältnis lethal zu sublethal geschädigter Zellen aus.

Beim Monolayerverfahren sinkt die Zellzahl gegenüber der unbehandelten Kontrolle, wenn Zellen

a) absterben
b) sich nicht mehr teilen
c) sich langsamer teilen

Bei der kolonienbildenden Agarmethode werden diejenigen Zellen einschließlich der Tochterzellen als Kolonien gemessen, die sich nach der Aussaat öfter als fünf mal teilen (siehe 2.2.3.). Wird durch das Zytostatikum die Zahl dieser Zellen auf irgend eine Weise eingeschränkt, so fällt die Koloniezahl ab.

Zellen aus Kulturen reagieren in den verschiedenen Wachstumsphasen verschieden sensibel gegenüber Zytostatika (77). Die Zellkulturen wurden deshalb drei bis vier Tage vor Versuchsbeginn passagiert, so daß sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden.

Für die Planung und Auswertung der Expositionsversuche mit Zytostatika sind zwei pharmakokinetische in vivo Parameter wichtig:

1) das Produkt aus Plasmakonzentration und Zeit (CXT)
2) die höchste im Plasma erreichte Zytostatikakonzentration (Peak Konzentration)

Von Tumoren in Mäusen und von Zellkulturen ist bekannt, daß die Stärke der zellulären Schädigung meist direkt vom Produkt aus Konzentration und Einwirkungszeit des Zytostatikums abhängt (56). Höchstwahrscheinlich besteht dieser Zusammenhang auch bei der in vivo Behandlung mit Zytostatika. Der Vergleich von dem hier in vitro angewandten Produkts aus Konzentration und Zeit mit dem von den einzelnen Zytostatika jeweils in vivo erreichten CXT ist also angebracht. Das CXT entspricht der Fläche unterhalb der empirisch gewonnenen Verlaufskurve des Zytostatika - Spiegels im Plasma.

Ob die Plasmakonzentration der einzelnen Zytostatika der jeweiligen Konzentration entspricht, die die einzelnen Zellen im Tumor auch erreicht, ist eher nicht anzunehmen.

Von den verwandten Konzentrationsstufen erscheint die 1/10 Peak - Konzentration klinisch am relevantesten. Zum einen erreicht eventuell nur ein kleiner Teil der Plasmakonzentration die Tumorzellen. Zum anderen wies SALMON (86) folgendes nach:
Die im semisoliden Agar gemessene Sensibilität eines Primärtumors gegen ein Zytostatikum entspricht nur dann auch dessen in vivo Sensibilität, wenn der Primärtumor in vitro schon gegen niedere Zytostatikakonzentrationen (z.B. 1/10 Peak Konzentration) sensibel ist.

Die Expositionsdauer der Zellen gegenüber dem Zytostatikum betrug 24 Stunden bei der Monolayer Methode und 1 Stunde bei der kolonienbildenden Methode. Damit war das Produkt aus Konzentration und Zeit beim Monolayer 24 mal höher. Das wirkte sich vor allem bei den Versuchen mit 1/10 Peak Konzentration aus. Die 1/10 Peak Konzentration führte im Monolayer immer zu einem stärkeren Abfall der Zell- bzw. Koloniezahl gegenüber der Kontrolle als im Agar.

Mit zunehmender Zytostatikakonzentration zeigte sich wie erwartet bei allen Zytostatika mit Ausnahme von DTIC im Agar eine Wirkungssteigerung und zwar bei beiden Methoden. Wenn die Expositionszeit fest ist, ist also der sublethale und lethale Schädigungsgrad von der zugefügten Zytostatikakonzentration abhängig.

Die Zytostatika im einzelnen:

Das Antibiotikum Actinomycin D wurde bei der SAOS-2 und der RD-Linie getestet (Abb. 28 - 32) und ist mit seiner Peak Konzentration bei beiden Methoden gut wirksam. Wohl wegen der unterschiedlichen Expositionszeit wirkt Actinomycin D bei 1/10 Peak Konzentration im Monolayer gut, jedoch im Agar nicht.

Das Produkt aus Konzentration und Expositionsdauer bei 1/10 Peak Konzentration im Monolayer ist 0,18 µg x h/ml und entspricht ziemlich genau der in vivo CXT von 0,182 µg x h/ml nach nur einmaliger Gabe von Actinomycin D (nach den derzeitigen Behandlungsprotokollen wird Actinomycin D in der Klinik an mehreren Tagen hintereinander gegeben).

Bei der RD - Zellinie erholen sich die Zellen im Verhältnis zur Kontrolle ab der 2. Woche nach vorherig 24-stündiger Exposition mit 1/10 Peak Konzentration (siehe Abb. 19). Beim entsprechenden Versuch mit Peak Konzentration ist das nicht der Fall.

Das Antibiotikum Adriamycin wurde bei der SAOS - 2 und den beiden Neuroblastomlinien SK - N - FI und IMR - 32 getestet. Am ehesten entspricht wieder die 1/10 Peak Konzentration mit dem Monolayer - Versuch den in vivo Bedingungen (CXT : in vitro 1,2 µg x h/ml, in vivo 1,38 µg x h/ml).
Die 1/10 Peak Konzentration zeigt im Agar keine (SAOS - 2) bis gute Wirksamkeit (IMR 32). Die Zellinien sind also verschieden sensibel gegenüber Adriamycin.

Die 1/10 Peak Konzentration wirkt im Monolayer (24 h Exposition) immer stärker als im Agar (1 h Exposition). Wenn dieser Abfall nicht methodenbedingt ist, ist die Wirkung von Adriamycin abhängig von der Expositionsdauer. Das würde der Folgerung von ALBERTS (4) widersprechen, daß die Wirkung der alkylierenden und anthrazyklinen Zytostatika rein konzentrationsabhängig sei.

Der Nitroharnstoff BCNU wurde bei den beiden Neuroblastomzellinien getestet.
Bei der kolonienbildenden Methode führt BCNU erst bei der nicht in vivo erreichbaren 10-fachen Peak Konzentration zu einem Abfall der Koloniezahl.
Bei der Monolayer Methode (24 h Exposition) wirkt BCNU bei Peak Konzentration deutlich. Bei 1/10 Peak Konzentration wirkt der Nitroharnstoff in der 1. Woche schwach und die

Neuroblastomzellen erholen sich in der 2. Woche völlig im Verhältnis zur Kontrolle.
Die in vivo CXT von BCNU beträgt wegen der kurzen Plasmahalbwertszeit (15 - 30 min) nur 1,02 µg x h/ml bei einer Peak Konzentration von 1,97 µg/ml. Bei der kaum wirksamen 1/10 Peak Konzentration im Monolayer beträgt das Produkt aus Konzentration und Expositionszeit 4,7 µg x h/ml. Die beiden Neuroblastomlinien sind also relativ resistent gegen BCNU als Einzelsubstanz.

Für das Nichtansprechen der Neuroblastomzellen gegen BCNU bis zur Peak Konzentration im Agar und für das überschiessende Wachstum der SK - N - FI Linie in der 2. Woche bei 1/10 Peak Konzentration (Abb. 21) könnte es folgende Erklärung geben: BCNU hat unter diesen Bedingungen keine Wirkung auf die Zellen, die in der Lage sind, sich zu teilen. Die Koloniezahl sinkt also nicht. Jedoch wird ein Teil der nichtteilungsfähigen Zellen abgetötet, die Zellzahl sinkt also in der 1. Woche. In der 2. Woche ist im Monolayer bei der Aussaat der Anteil der teilungsfähigen "Stammzellen" größer; es kommt gegenüber der Kontrolle zum überschießenden Wachstum.
DTIC wirkt im Agar bis zur 10-fachen Peak Konzentration nicht. Im Monolayer wirkt es bei 1/10 Peak Konzentration kaum, bei Peak Konzentration schwach bis mittelstark.

Die 1/10 Peak Konzentration mit 24 h Exposition entspricht der klinischen Behandlung,wenn DTIC nur 1 mal in der üblichen Dosis von 250 mg/$m^2$ gegeben wird ( in vitro CXT = 36 µg x h/ml, in vivo CXT = 31 µg x h/ml). Unter diesen Bedingungen wäre DTIC als Einzelsubstanz bei unseren Zellinien fast wirkungslos. Bei den zur Zeit gängigen klinischen Behandlungsschemen wird DTIC jedoch an mehreren Tagen hintereinander gegeben. DTIC könnte stärker wirken. Die 1 x DTIC ausgesetzten Zellen erholen sich ab der 3. Woche nicht nur nach Exposition mit 1/10 Peak Konzentration, sondern auch mit Peak Konzentration.

Die Schwermetallverbindung Cis - platinum wurde bei allen Zellinien getestet.
Bei der Monolayer Methode gehört Cis - platinum zu dem sehr gut wirksamen Zytostatika wie Adriamycin, Vincristin und VP - 16. Im Agar wirkt Cis - platinum schwächer als die drei genannten. Vom Produkt aus Konzentration und Expositionszeit entspricht jedoch die einstündige Expositionszeit mit Peak Konzentration der kolonienbildenden Methode am ehesten den in vivo Bedingungen. (in vitro CXT =2,5 µg x h/ml, in vivo CXT = 1,94 µg x h/ml).

Der Folsäureantagonist Methotrexat wurde nur bei der Osteosarkomlinie SAOS - 2 getestet. Die Peak Konzentration entspricht derjenigen Plasmakonzentration, die mit der klinischen Hochdosis - Therapie erreicht wird. MTX war bei beiden Methoden hochwirksam. (Serumspiegel $10^{-4}$ mol/l MTX bei 12 $g/m^2$ MTX).

Vincristin wurde bei der RD -, der SK - N - FI und der IMR 32 Linie getestet, VP - 16 bei der SAOS - 2, RD und SK - N - FI.

Beide Zytostatika wirkten in beiden Methoden mit allen Konzentrationsstufen gut bis sehr gut, also auch schon bei 1/10 Peak Konzentration nach 1 Stunde Exposition.
Die ähnlichen Kurvenverläufe beider Zytostatika in den Dosis - Wirkungskurven sind eventuell auf einen ähnlichen Wirkungsmechanismus zurückzuführen.

Die IMR - 32 Zellinie spricht viel schlechter auf Interferon an als die SK - N - FI Linie (siehe 3.4.). Trotzdem sind sich die Verlaufskurven der einzelnen Zytostatika zwischen den beiden Neuroblastomlinien jeweils viel ähnlicher als im Vergleich zu einer der beiden anderen (Nicht-Neuroblastom) Zellinien.

| "Generic name" | ausgetestete Zellinie | Gesamt-Wirksamkeit ( 0, +, ++, +++ ) Agar (1 h) | Monolayer (24 h) | Wirksamkeit bei 1/lo Peak Konzentration Agar (1 h) | Monolayer (24 h) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Actinomycin D | SAOS - 2 | ++ | ++ | 0 | + | Erholung im Monolayer bei 1/lo P.C. |
| | RD | ++ | ++ | 0 | ++ | |
| Adriamycin | SAOS - 2 | ++ | +++ | 0 | ++ | |
| | SK - N - FI | ++ | +++ | + | +++ | |
| | IMR 32 | +++ | +++ | ++ | +++ | |
| BCNU | SK - N - FI | n.d. | + | n.d. | 0 | |
| | IMR 32 | 0 - + | + | 0 | 0 - + | |
| DTIC | RD | 0 - 1 | + | 0 | 0 | |
| | SK - N - FI | 0 | + | 0 | 0 - 1 | |
| | IMR 32 | 0 | + | 0 | 0 | |
| Cis-platinum | SAOS - 2 | ++ | ++ | 0 | + | |
| | RD | ++ | +++ | 0 | ++ | |
| | SK - N - FI | + | +++ | + | +++ | |
| | IMR 32 | + | +++ | + | +++ | |
| Methotrexat | SAOS - 2 | +++ | +++ | ++ | ++ | |
| Vincristin | RD | +++ | +++ | +++ | +++ | Vincristin und VP 16 haben einen ähnlichen Kurvenverlauf |
| | SK - N - FI | ++ | +++ | + | +++ | |
| | IMR 32 | +++ | +++ | ++ | +++ | |
| VP 16 | SAOS -2 | +++ | +++ | + | ++ | |
| | RD | ++ | +++ | +++ | +++ | |
| | SK - N - FI | +++ | n.d. | +++ | n.d. | |

## 4.8. Diskussion der Kombinationsergebnisse

Es sind zur Zeit folgende Möglichkeiten denkbar, durch welche eine effektive antiproliferative Kombination von Medikamenten erreicht werden kann (33).

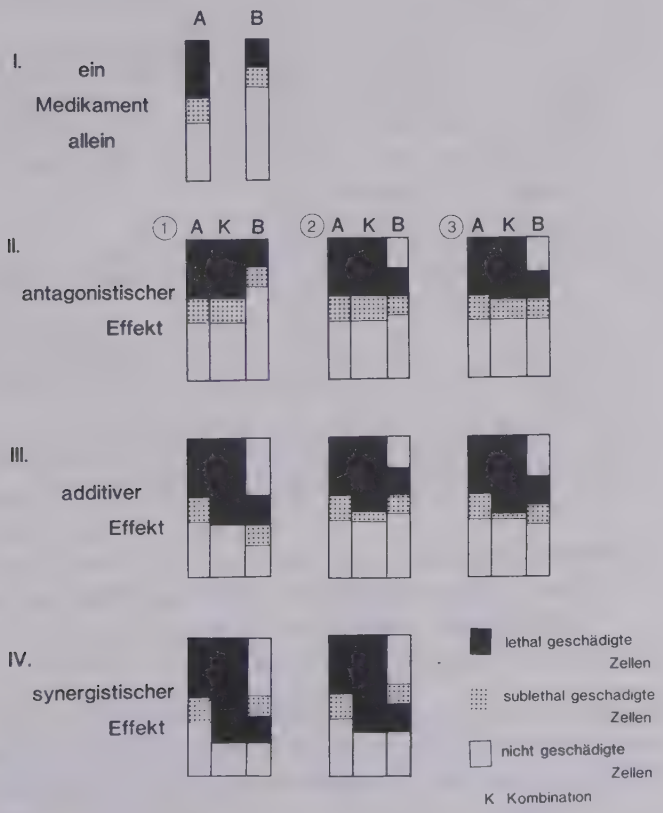
1. Manipulation der Wachstumskinetik durch
   a. gleichzeitige Gabe von 2 Medikamenten, die in verschiedenen Stadien des Zellzyklus wirksam sind.
   b. Synchronisation der Zellen in eine Phase durch das erste Medikament und anschließender Gabe des für diese Phase toxischen Medikaments.
2. Selektiver Angriff von Medikamenten, die nicht additiv toxisch sind, aber einen additiven therapeutischen Effekt versprechen. Nach diesem Gesichtspunkt wurden die meisten in der Klinik verwendeten Kombinationen ausgewählt.
3. Durch einen "Rescue Effekt" wie bei MTX durch Citrovorum.
4. Durch biologische Synergismen
   a. Hemmung von verschiedenen Enzymen in einer Enzymkette
   b. gleichzeitige Hemmung von alternativen Stoffwechselwegen für die Synthese essentieller Metaboliten
   c. komplementäre Hemmung durch Medikamente, von denen eines Makromoleküle schädigt und das andere den Reparaturmechanismus hemmt.
   d. Schädigung der Zellmembrane durch das eine Medikament ermöglicht das Eindringen des zweiten toxischen Medikaments.

Wie bei alleiniger Zytostatikaexposition ist es auch hier möglich, von der Target Theorie auszugehen (3.7.).

Um den Mechanismus der Wirkung von 2 Medikamenten auf eine Zellpopulation zu veranschaulichen, wurde ein einfaches Modell entworfen (Abb. 36).

Die Kombinationswirkung wird durch den verwendeten statistischen Test in 3 Kategorien, antagonistisch, additiv und synergistisch eingeteilt.

Abb. 36 Modell einer Interaktion nach sequentieller Gabe 2er Medikamente A und B



Erläuterungen zu Abb. 36:

zu I. Wenn die Medikamente einzeln gegeben werden, töten sie einen Teil der Zellen ab, einen weiteren Teil schädigen sie und der Rest überlebt ohne Veränderungen (siehe 3.7.).

Antagonistische Ergebnisse* erhalten wir:

zu II.1 B "schädigt lethal oder sublethal" von A bereits abgetötete Zellen.

II.2 B "tötet" von A bereits abgetötete Zellen und schädigt von A schon geschädigte Zellen. Die gemeinsame Schädigung bleibt aber unter dem kritischen Punkt, die Zellen überleben.

II.3 Wie II.2, nur daß B von A geschädigte Zellen abtötet. Von hier ist der Übergang zur Subadditivität hin zu einem additiven Effekt fließend und lediglich eine Frage der Quantität, bzw. der statistischen Signifikanz.

Additivität (III) wird beobachtet:

zu III.1 B "tötet die von A sublethal geschädigten oder ungeschädigten Zellen ab.

III.2 B "tötet" die von A schon lethal geschädigten Zellen ab, aber die sublethale Wirkung beider addiert sich.

III.3 B "tötet" von A abgetötete oder geschädigte Zellen und die sublethalen Wirkungen addieren sich teilweise.

Synergismus (IV) tritt auf:

zu IV.1 B von A nicht geschädigte Zellen abtötet und die sublethalen Wirkungen sich ganz,

IV.2 oder teilweise addieren.

*Der von DREWINKO übernommene Antagonismusbegriff sagt nur aus, daß die Kombinationswirkung "signifikant nicht additiv" ist und ist damit nicht identisch mit dem Antagonismusbegriff der "gegenseitigen Behinderung" der Wirkung.

Es wurden in der Zeichnung jeweils Extreme dargestellt, zwischen denen alle Variationen möglich sind.
Wie DREWINKO (33) anführt, erwartet man bei Anwendung dieses Modells und des statistischen Testes weit mehr positive Interaktionen als in der klinischen Situation. Die Zellen befinden sich in der logarithmischen Wachstumsphase, so daß die meisten Zytostatika auf optimale Wirkungsbedingungen treffen (35).

Zusätzlich haben bei in vitro Versuchen die Zytostatika die Möglichkeit einer direkteren, toxischen Wirkung auf Zellen als bei in vivo Versuchen.

Hinzu kommt die, gemessen an klinischen empirischen Studien, kurze Beobachtungszeit, wodurch die Probleme einer Resistenzentwicklung und Remission der Tumorzellen außer acht gelassen werden, die aber letztendlich den Nutzen und Gebrauch in der Klinik bestimmen.

Die methodischen Schwierigkeiten von in vitro Versuchen wurden in 2.2.6. (Fehlerbetrachtung) schon ausgeführt. Andererseits können gerade solche effizient und ökonomisch durchzuführende in vitro Versuche den Hinweis für erfolgversprechende Kombinationen geben.
Es wurden erst einige wenige Untersuchungen über die Kombinationswirkung von Interferon und Zytostatika veröffentlicht. Im ersten veröffentlichten Bericht von CHIRIGOS und PEARSON 1973 (24) wurde ein synergistischer Effekt von BCNU und Mäuse - IFN im Tierversuch mit LSTRA Mäusen beobachtet.
GRESSER berichtete 1975 (4) von einem möglichen additiven Effekt mit der Kombination Cyclophosphamid und Mäuse - IFN - $\alpha$ nach der Diagnose Lymphom in AKR Mäusen, bei einer Verlängerung der Überlebenszeit um 200 % gegenüber alleiniger Cyclophosphamidbehandlung.

Diese beiden Untersucher verabreichten die Zytostatika nur zu Versuchsbeginn und Interferongabe wurde über mehrere Tage wiederholt. Dies ist deshalb von großem

Interesse, da SLATER (92) in Versuchen mit BDF/1 Mäusen mit $L_{1210}$ Leukämie bei gleichzeitiger Gabe von Mäuse - IFN -$\alpha$ und 6 - Mercaptopurin, ADR, Cytosinarabinosid oder Cyclophosphamid über mehrere Tage keine signifikante Steigerung der Überlebensrate fand. In der gleichen Untersuchung erreichte er aber mit MTX und IFN -$\alpha$ oder MTX und 6 - Mercaptopurin und IFN -$\alpha$ eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit.

Es gibt erst 2 Untersuchungen mit menschlichen Tumorzelllinien.

BROSTRÖM (19) untersuchte die Kombinationswirkung von MTX und IFN -$\alpha$ auf 2 Osteosarkomlinien und eine Lymphomlinie vom BURKETT Typ. Er beobachtete die Zellen 14 Tage im Monolayer, bzw. in der Suspensionskultur, er wertete 2 mal wöchentlich aus und wiederholte im Anschluß daran gleichzeitig die MTX und IFN - Gabe. Er schließt aufgrund seiner Überlebenskurven, daß die Kombination von MTX und IFN weder einen synergistischen noch hemmenden oder blokkierenden Effekt auf das Zellwachstum bewirkte. Die Ergebnisse wurden keinem statistischen Test unterworfen oder eine Analyse der Daten für einen additiven Effekt durchgeführt.

Die andere Untersuchung wurde von AAPRO 1982 (1) veröffentlicht. Er testete mit der Agarmethode mehrere Zytostatika mit IFN -$\alpha$ bei verschiedenen Linien. In dem Abstrakt sind die Ergebnisse mit der Myelomlinie 8226 bei Vinblastingabe und IFN -$\alpha$ dargestellt.
Es ergaben sich mit einstündiger Vinblastinexposition und anschließender einstündiger oder Dauerinterferonzugabe keine Synergismen, aber eine viel stärkere Wirkung der Kombination mit Unterschreitung des Erwartungswertes. Hingegen wurde bei Dauerexposition beider Medikamente ein signifikanter Synergismus gemessen.

Da es unmöglich war, alle Kombinationen zu untersuchen, beschränkte (siehe 3.8.) sich diese Arbeit auf einige wenige. Es wurde untersucht, ob nach zeitbegrenzter Zytostatikaexposition durch nachfolgende IFN-Gabe die Zellzahl weiter reduziert werden kann.

Als Zusammenfassung der Resultate wird eine U - Werte Tabelle (siehe Nebenseite) der Diskussion der Ergebnisse vorangestellt.

Diskussion der einzelnen Zellinien:
Bei der osteogenen Sarkomlinie SAOS - 2 lagen mit MTX und IFN - ß die U - Werte beider Methoden im additiven Bereich, der U - Wert der Monolayer Methode ist allerdings um fast 4 höher. Man muß hier die Entwicklung über 3 Wochen (siehe 3.8.3.) betrachten, mit einem antagonistischen U - Wert in der 1. Woche und einem additiven U = - 1,0 in der 3. Woche. Trotzdem war die Kombinationswirkung in der ersten Woche effektiver als die mit nur einem der beiden Medikamente.
Mit der Kombination MTX und IFN haben bereits BROSTRÖM (19) und SLATER (92) Versuche durchgeführt.
Bei BROSTRÖM war mit der Monolayer Methode bei der Osteosarkomlinie 393 T mit MTX und IFN -$\alpha$ der Kombinationseffekt nach 14 Tagen weitaus ausgeprägter als nach 4 Tagen. Bei seiner anderen Osteosarkomlinie $T_2$ 56 schwankt der Kombinationswert um den wirksamsten Einzelwert.

U - Werte Tabelle der Kombinationsergebnisse Interferon und Zytostatika

| | SAOS - 2 | | | RD | | | IMR 32 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Agar M. | Monolayer M. W | Monolayer M. $W_n$ | Agar M. | Monolayer M. W | Monolayer M. $W_n$ | Agar M. | Monolayer M. W | Monolayer M. $W_n$ |
| Acto D | - 6,7 | - 1,9 | + 0,2<br>- 4,9<br>- 0,7 | - 0,4 | - 1,6 | - 4,8<br>- 0,1<br>- 1,3 | | | |
| ADR | - 3,5 | - 3,2 | + 1,8<br>- 4,6<br>- 4,6 | | | | | - 2,0 | - 2,3<br>- 2,5<br>- 1,2 |
| Cis-p. | - 7,o | - 6,o | - 1,5<br>- 7,7<br>- 5,8 | | - 0,3 | - 0,2<br>+ 0,1<br>- 1,0 | - 4,6 | - 1,4 | - 2,1<br>- 0,4<br>- 1,7 |
| DTIC | | | | + 1,6 | + 0,5 | + 1,5<br>+ 0,4<br>- 0,4 | - 2,3 | - 1,8 | - 2,3<br>- 2,7<br>- 0,3 |
| MTX | - 1,9 | + 2,0 | + 9,0<br>- 0,1<br>- 1,0 | Synergismus : U $\leq$ - 2,58<br>Additiv : U $\leq$ \|2,58\|<br>Antagonismus: U $\geq$ + 2,58 | | | | | |
| Vin. | | | | - 1,8 | + 0,6 | + 0,1<br>+ 1,5<br>+ 0,1 | - 2,6 | - 2,4 | - 4,3<br>-12,0<br>- 1,7 |
| VP 16 | - 7,7 | - 3,6 | - 0,2<br>- 6,0<br>- 2,9 | - 0,3 | - 2,3 | - 3,9<br>- 0,9<br>- 2,0 | - 5,6 | - 2,3 | - 2,9<br>- 1,6<br>- 2,1 |

W = Durchschnittswert von 3 Wochen ; $W_n$ = Einzelwerte der Wochen bei der Monolayer M.

SLATER (92) fand gerade mit MTX und IFN -α im Gegensatz zu anderen Zytostatika in der Behandlung der Mäuseleukämie einen Synergismus.
Es stellt sich jetzt die Frage, wie weit die Unterschiede der Ergebnisse abhängig sind von der verwendeten Zellinie, der Verschiedenheit der Methoden, der IFN - Dosis, dem Interferon Typ oder vom Therapieschema (siehe oben).

Von den anderen hier getesteten Zytostatika bei der SAOS-2 wurden mit ADR, Cis - p. oder VP - 16 und IFN - ß die Erwartungswerte signifikant unterschritten, mit Acto D und IFN - ß auch bei der Agarmethode. Sämtliche U - Werte,mit Ausnahme derer von ADR und Cis - p.,waren bei der Agar - Methode wesentlich niedriger.
Dies kann methodenbedingt sein oder wurde durch die, bei der Agarmethode verwendeten höheren Zytostatikakonzentrationen verursacht. Werden allerdings die U - Werte nach der 2. Woche bei der Monolayer Methode mit denen der Agar-Methode verglichen, sind die Unterschiede nicht mehr wesentlich.
Für die SAOS - 2 kann man zusammenfassend sagen, daß mit beiden Methoden die Ergebnisse mit allen Kombinationen in die gleiche Richtung eines additiven Effekts bei MTX, eines zumindest additiven bei Acto D und einer synergistischen Wirkung von ADR, Cis - p. oder VP - 16 mit Interferon hinweisen.

Die Kombinationsergebnisse bei der Rhabdomyosarkomlinie RD lagen alle im additiven Bereich.
Der größte U - Wert Abstand zwischen beiden Methoden betrug 2. Da mit der Ausnahme von Acto D bei beiden Methoden dieselben Zytostatikakonzentrationen verwandt wurden, müssen solche Schwankungen als methodenbedingt betrachtet werden.
Mit DTIC und IFN - ß erhielt man mit beiden Methoden positive U - Werte, so daß diese Kombination als nicht besonders effektiv angesehen werden muß.
Es bleibt die Frage, warum die RD - Linie weniger sensibel

auf die Kombination von Interferon mit Zytostatika reagiert als die SAOS - 2. Man kann die Ursache entweder in der Gewebsspezifität der Linien oder der viel geringeren Interferonempfindlichkeit der RD - Linie suchen.

Zusammenfassend gilt für die RD - Linie, daß mit beiden Methoden ähnliche Ergebnisse erzielt wurden und weder ein Synergismus noch eine Hemmung mit der Kombination beobachtet wurde. Der Kombinationseffekt ist wesentlich geringer ausgeprägt als bei der SAOS - 2.

Die Kombinationseffekte bei der relativ interferonunempfindlichen Neuroblastomlinie IMR - 32 sind am zweit stärksten ausgeprägt. Die Unterschiede zwischen den Zellinien können also vorläufig nicht auf eine verminderte Interferonempfindlichkeit zurückgeführt werden.
Alle U - Werte sind deutlich negativ, bei der Agarmethode niedriger und bei ihr für Cis - p., Vin., oder VP - 16 mit IFN - ß synergistisch. Die IMR - 32 ist nach diesen Ergebnissen für eine solche Kombinationsbehandlung geeignet.

Nach der Diskussion der einzelnen Resultate soll erörtert werden, in wieweit der Kombinationseffekt von folgenden Faktoren abhängig ist:

1. von der Unterschiedlichkeit der Zellinien
2. von der Verschiedenheit der angewandten Methoden
3. von der Empfindlichkeit der Linien gegenüber IFN
4. von der Konzentration der beteiligten Medikamente
5. von den
   a) angewandten Zytostatika und
   b) Interferonen
6. vom angewandten Therapieschema (Time scheduling).

zu 1. Die erste Frage ist beim Vergleich der Ergebnisse der RD - Linie mit IMR - 32 leicht zu beantworten. Man erhielt unter Konstanthaltung aller anderen Parameter deutlich verschiedene U - Werte;

der Kombinationseffekt ist also abhängig von der Zellinie (siehe auch Vergleich mit BROSTRÖM und SLATER). Gemeinsam war allen Zellinien, daß die Kombination immer wirksamer war als Einzelbehandlung, es konnten keine hemmenden oder blockierenden Effekte festgestellt werden.
Besonders Tumore, die der SAOS - 2 entsprechen, die also sehr empfindlich auf Interferon reagieren, scheinen für eine derartige Kombinationsbehandlung geeignet zu sein.

zu 2. Es wurden wie oben im Text schon angesprochen, größere Unterschiede der U - Werte und damit der Ergebnisse mit beiden Methoden erzielt, wobei mit der Agar Methode meist die niedrigeren U - Werte errechnet wurden. Gründe für diese Unterschiede wurden in 4.2. (Methodenvergleich ausführlich diskutiert.
Als Gemeinsamkeit muß auf die mit beiden Methoden in die gleiche Richtung weisende Ergebnisse hingewiesen werden; bzw. die U - Werte waren sich zwischen beiden Methoden innerhalb der gleichen Linien ähnlicher in Größe und Abstand, als mit der gleichen Methode zwischen 2 Linien.

zu 3. Bei der mit Abstand am sensibelsten Linie SAOS - 2 waren die U - Werte wesentlich niedriger als bei den anderen Linien. Man kann damit behaupten, daß sich interferonempfindliche Tumore besser für eine Kombination eignen, zumal dann der Mockeffekt (siehe 3.3.) keine Rolle spielt.

zu 4. Eigentlich ist es sinnvoll Kombinationsversuche mit absteigenden Konzentrationen der Medikamente durchzuführen. Eine solche Vorgehensweise macht die Ergebnisse zum einen um vieles valider, und zum anderen ließe sich die Frage der Konzentrationsabhängigkeit des Kombinationseffektes gleich mitbeantworten.
Solche Untersuchungen konnten aus Zeitgründen nicht mehr angegangen werden, sie sind aber für die Weiterarbeit an einer Kombinationsbehandlung dringend erforderlich.

zu 5a. Alle Kombinationen wurden mit IFN - β durchgeführt. In allen anderen bisher unternommenen Kombinationsversuchen wurde IFN - α verwendet. Von keinem Untersucher wurde berichtet, daß Zytostatika in ihrer Wirkung durch IFN gehemmt werden.
Die Kombination beider Medikamente war zumindest ebenso effektiv wie die Einzelbehandlung, auch mit IFN - α wurde über additive und synergistische Wirkungen berichtet. Eine interferonvergleichende Kombinationsuntersuchung, in die IFN - γ (3.5.) einbezogen ist, gibt es noch nicht.

zu 5b. Es wurde versucht, eine möglichst große Zahl von Zytostatika zu testen. Dieselben Zytostatika unterschieden sich in der Stärke der kombinierten Wirkung mit IFN - ß teilweise erheblich bei den verschiedenen Linien; vgl. U - Werte von VP 16 und IFN - ß bei SAOS - 2.
Trotzdem kann man die Zytostatika in verschiedene Gruppen ihrer Wirksamkeit in der Kombination einordnen. Cis - p. war das wirksamste, gefolgt von VP - 16 und ADR. Eine mittlere Gruppe bilden Acto D und Vin.. Mit MTX und mit DTIC schließlich wurde bei einstündiger Zytostatikaexposition kein Synergismus beobachtet.

zu 6. Mit der Agar - Methode wurde immer dassselbe Therapieschema verwendet. Bei der Monolayer - Methode wurden die Zellen im ersten Kombinationsversuch 24 h den Zytostatika ausgesetzt (siehe 3.8.1.). Die mit diesem Schema erhaltenen Resultate mit DTIC und IFN - ß bei der SK - N - FI U = -2,9 und IMR - 32 U = -3,2 können mit dem nach einstündiger Zytostatikaexposition mit der IMR - 32 U = -1,8 verglichen werden. Beide Ergebnisse weisen auf einen mehr als additiven Effekt der Kombination hin, mit 24 h Zytostatikaexposition wird der Erwartungswert sogar signifikant unterschritten. Eine längere DTIC - Exposition

bringt ein erheblich besseres Ergebnis, dies wird auch am Verlauf des Kombinationseffekts über 3 Wochen deutlich (siehe 3.8.3.). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da DTIC bei einstündiger Exposition den geringsten bzw. fast keinen Eigeneffekt zeigte.
Derselbe Effekt ist bei 1 h Zytostatikaexposition bei der SAOS - 2 mit Acto D, Cis - p. oder MTX und IFN - ß (siehe 3.8.3.), bei der RD mit DTIC, Vin. oder VP - 16 und IFN - ß (s. 3.8.3.) zu sehen.

Ein begrenzender Faktor in der Tumorbehandlung ist die Nebenwirkung der Medikamente. Die Nebenwirkungen nach Interferongabe sind, besonders im Verhältnis zu denen nach anderen Chemotherapeutika relativ gering (97, 108), und es wurde bisher über keine überlappende Toxizität mit Zytostatika berichtet (97,108). Daher könnten selbst weniger als additive Effekte,die auch nach einer Relativierung der Ergebnisse zu erwarten sind, ein Fortschritt in der Tumorbehandlung bedeuten.

Hinzu kommt, daß IFN nur einen Teil seiner antiproliferativen Wirkung direkt auf Zellen ausübt (63, 73).
Ein anderer Teil der Interferonwirkung wird in vivo über das Immunsystem vermittelt:
Hemmung der B - Zellaktivität durch IFN (42), aber Stimulation der Phagozytose (89), der Zytotoxizität von Killer und NK - Zellen (90). Es ist denkbar, daß dadurch die Interferonwirkung bei der Tumorbehandlung noch verstärkt wird.
In vivo kompliziert die Hemmung des Immunsystems durch Zytostatika jedoch die Einschätzung dieser Wirkung.

Diese Untersuchungen lassen eine Kombinationsbehandlung von IFN - ß und Zytostatika in der Tumortherapie

als eine mögliche Verbesserung der Behandlung erscheinen.

Veränderungen des Therapieschemas (Time scheduling) scheinen eine vielversprechende Entwicklung auf der Suche nach effizienteren Kombinationen zu sein. BENZ u.a. (12) erreichten in der Kombination von Zytostatika enorme Wirkungssteigerungen nach Veränderung der zeitlichen Verabfolgung der Medikamente.

Mit der Kombination IFN und Zytostatika gibt es hierzu erst eine Veröffentlichung von CESARIO (23), der allerdings Veränderungen des antiviralen Effektes von IFN -$\alpha$ und IFN - ß nach vorhergehender oder gleichzeitiger Gabe von Zytostatika untersuchte. Bei Vorbehandlung der Zellen mit VCR, 6 Mercaptopurin und ADR oder bei gleichzeitiger Gabe von Vin. und IFN, war die antivirale Aktivität beider Interferone vermindert. Diese Untersuchung gewinnt an Bedeutung angesichts der wahrscheinlichen Parallelität der antiviralen und antiproliferativen Wirkung von Interferon (99).

Deshalb wird ein Austesten von verschiedenen Kombinationen wichtig werden für weitere in vitro Untersuchungen und eine mögliche Verbesserung ihrer Anwendung in der Klinik.

Eine Zytostatikatherapie kann einen Tumor meist wesentlich verkleinern, eliminiert jedoch selten alle bösartigen Zellen. Bei kleiner Tumormasse zeigt IFN (GRESSER) 43, 47, 48) seine größte Effekttivität; eine Remission kann verlängert, vielleicht sogar ein Rezidiv verhindert werden (102, 108).
Bei 24 h Zytostatikaexposition der SK - N - FI und IMR - 32 mit DTIC erholen sich die Zellen nach der 2. Woche von der DTIC - Wirkung (siehe 3.8.1.). Durch fortgesetzte IFN - Gabe in der Kombination wird diese Erholung weitgehend verhindert.

## V. Zusammenfassung

Die bisherigen Therapieerfolge mit Interferon als Monotherapie in der Onkologie ergaben bisher nur in Einzelfällen bessere Erfolge als mit den heute üblichen zytostatischen Substanzen. Deshalb wird zur Zeit versucht, Interferon in die Zytostatikatherapie zu integrieren.

Es gibt jedoch erst wenige in vitro Untersuchungen, aus denen Hinweise für die kombinierte Wirkung von Interferon und Zytostatika entnommen werden können.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war zu prüfen, ob durch die Kombination von Interferon mit Zytostatika die Tumorzellen vermehrt in ihrem Wachstum gehemmt werden, als jeweils mit der Einzelsubstanz.
In den Versuchen wurden humane Tumorzellinien aus osteogenem Sarkom (SAOS - 2), Rabdomyosarkom (RD) und Neuroblastomzellen (SK - N - FI und IMR 32) benützt.
Als Methode wurde die Monolayer Technik verwendet, dabei wächst in einer Nährlösung ein einschichtiger Zellrasen auf Plastikböden. Zur Auswertung werden die Zellen abgelöst und ausgezählt. Dieser Vorgang ist wiederholbar, die Zellen sind jederzeit einer medikamentösen Manipulation zugänglich und das Wachstum kann über mehrere Wochen verfolgt werden.

Durch die Untersuchungen wurden folgende Ergebnisse erhalten :

1. Cloniertes Interferon $\alpha_2$ ist gering schwächer antiproliferativ wirksam als IFN -$\alpha$ aus Leukozyten.
   IFN - ß übt einen fast 10-fach, IFN - $\gamma$ (Immuninterferon) einen fast 100-fach stärkeren wachstumshemmenden Effekt aus als beide alpha Interferone.
2. Die SAOS - 2 Zellinie reagiert auf Interferonbehandlung mit Abstand am sensibelsten, gefolgt von der SK-N-FI. IMR 32 und RD Linie.

3. Bei wöchentlich 4-tägiger Interferonexposition verringert sich die Zellzahl kontinuierlich nach der 2. und 3. Woche. Von einer einmaligen 4tägigen Interferonexposition erholen sich die Zellen nach 2 bis 3 Wochen.

4. Mock, eine Interferonpräparation mit wärmeinaktiviertem Interferon beta, hemmt in hoher Dosierung das Zellwachstum.

5. Von den getesteten Zytostatika waren DTIC und BCNU als Monosubstanz am wenigsten wirksam.

6. Die Kombination von Interferon und Zytostatika war immer wirksamer als die Behandlung mit der Einzelsubstanz und dies umso mehr die Zellinie interferonsensibel war. Eine durch einmalige Zytostatikabehandlung reduzierte Zellzahl verringert sich durch wöchentliche Interferongabe weiter.

7. Von den einzelnen Kombinationen war Cis-p. mit IFN sowie VP 16 mit IFN am wirksamsten. Eine mittlere Gruppe bildeten ActoD, ADR und VCR mit Interferon. Am ineffektivsten waren die Kombinationen MTX mit IFN und DTIC mit IFN.

8. Die Ergebnisse wurden mit denen einer kolonienbildenden Agar Methode (Dissertation von J. Buck) verglichen, die in die gleiche Richtung weisen.

Diese Ergebnisse lassen eine Kombinationsbehandlung von IFN - ß und Zytostatika als eine mögliche Verbesserung der Behandlung - zumindest bei interferonsensiblen Tumoren - erscheinen.

Literaturverzeichnis

1. AAPRO , M.S., SALMON, S.E., ALBERTS, D.S.:
Schedule dependent synergism of vinblastine and cloned leukocyte interferon A.
Third conference on human tumor cloning. Tuscon, AZ., January 10-12, (1982)

2. ADAMS, A., STRANDER, H., CANTELL, K.:
Sensitivity of the Epstein-Barr virus transformed human lymphoid cell lines to interferon.
J. gen. Virol. 28, 206 - 207 (1975)

3. AGUET, M.:
High-affinity binding of $^{125}$I-labelled mouse interferon to spezific cell surface receptor.
Nature 284, No. 5755, 459 - 461 (1980)

4. ALBERTS, D.S., VAN DAALEN WETTERS, T.:
The effekt of phenobarbital on cyclophosphamide anti-tumor activity.
Cancer Research 36, 2785 - 2789 (1976)

5. ALBERTS, D.S., VAN DAALEN WETTERS, T.:
Rubidazone vs adriamycin : An evaluation of their differential toxicity in the spleen colony assay system.
Br. J. Cancer 34, 64 - 68 (1976)

6. ALBERTS, D.S., CHEN, H.-S.G., SALMON, S.E.:
In vitro assay : Pharmacologic considerations.
aus: SALMON, S.E.: Cloning of the human tumor stem cell system. 197 - 207, New York, (1980)

7. ALBERTS, D.S., CHEN, H.-S.G.:
Tabular summary of pharmacokinetic parameters relevant to in vitro drug assay.
aus: SALMON, S.E.: Cloning of human tumor stem cells 351 - 359, New York, (1980)

8. ANKEL, H., KRISHNAMURTI, C., BESANCON, F., STEFANOS, S., FALCOFE, E.:
Mouse fibroblast (type I) and immune (type II) interferons: Pronounced differences in affinity for gangliosides and in antiviral and antigrowth effects on mouse leukemia $L_{1210}$ cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, No. 5, 2528-2532 (1980)

9. BALKWILL, F., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J., FANTES, K H.:
Human lymphoblastoid interferon can inhibit the growth of human breast cancer xenografts in athymic mice.
Europ. J. Cancer 16, 669-573 (1980)

10. BARENNDSEN, G.W.:
Analysis of tumor responses by excision and in vitro assay of cellular clonogenic capacity.
Br. J. Cancer 41, Suppl. IV, 209-216 (1980)

11. BARON,S., ISAACS, A.:
Absence of interferon in lungs from fatal cases of influenza.
Brit. Med. J. 56, 18-20 (1962)

12. BENZ, C., SCHOENBERG, M., CHOTI, M., CADMAN, E.ß
Schedule dependent cytotoxicity of methotrexate and 5-fluorouracil in human colon and breast tumor cell lines.
J. Clin. Invest. 66, 1162-1165 (1980)

13. BERISH, Y., GUPTA, R., GUPTA, S.:
Differential efficacies of human type I and type II interferon as antiviral and antiproliferative agents.
Cell Biology 77, No. 10, 5928-5932 (1980)

14. BLALOCK, J.E., GEORGIADES, J.A., LANGFORD, M.P., JOHNSON, H.M.:
Purified human immune interferon has more potent anticellular activity than fibroblast or leukocyte interferon.
Cellular Immunology 49, 390 - 394 (1980)

15. BLEEHEN,N.M., STEPHENS, T.C.:
Chairman's summary of Section V.
Clonogenic cell survival after tumor excision.
Br. J. Cancer 41, Suppl. IV 257 - 258 (1980)

16. BORDEN, E.:
Interferon in recurrent breast cancer:
Prelimary report of the Amerikan Cancer Siciety
clinical trials programm
Proc. A. A. C. R. abstr. 643 (1980)

17. SORECKY, L., FUCHSBERGER, N., HAUNICKA, V., STANCEK,D.,
ZEMLA, J.:
Distribution of antiviral and cell - inhibitory
activity in interferon preparations.
Acta Virol. 16, 356 - 358 (1972)

18. BRADLEY, E.C., RUSCETTI, F.W.:
Effect of fibroblast, lymphoid, and myeloid interferon
on human tumor colony formation in vitro.
Cancer Research 41, 244 - 249 (1981)

19. BROSTRÖM, L.-A.:
Combined effect of interferon and methotrexate on
human osteosarcoma and lymphoma cell lines.
Cancer Letters 10, 83 - 90 (1980)

20. BROWN, J.M., RASEY, J.S.:
Chairman's summary of Section VI.
Intercomparisons of im situ and cell survival assays.
Br. J. Cancer 41, Suppl. IV, 312 - 314 (1980)

21. CANTELL, K., HIRVONEN, S.:
Preparation of human leukocyte interferon for
clinical use.
Tex. Rep. Biol. Med. 35, 138 - 144 (1977)

22. CARNEY, D., GAZDAR,
In vitro cloning of small cell carcinoma of the lung.
In press (1982)

23. CESARIO, T.C., SLATER, L.M.:
Diminished antiviral effect of human interferon in the presence of therapeutic concentrations of antineoplastic agents.
Infection and Immunity, 27. No. 3, 842 - 845 (1980)

24. CHIRIGOS, M.A., PEARSON, J.W.:
Cure of murine leukemia with drug and interferon treatement.
J. Natl. Cancer Institute 51, No. 4, 1367 - 1368(1973)

25. COCITO, D., De MAEYER, E., DESOMER, P.:
Metabolism of nucleic acids in uninfected fibroblasts incubated in vitro with rat interferon.
Life Sci. 4, 1253 - 1262 (1965)

26. CRANE, J.L. jr., GLASGOW, L.A., KERN, E.R.,YOUNGNER,J.S.:
Inhibition of murine osteogenic sarcomas by treatment with type I or Type II interferon.
J. Natl. Cancer Inst. 61, No.3, 871 - 874(1978)

27. CUPPLES, C.G., TAN, Y.H.:
Effect of human interferon preparations on lymphoblastogenesis in Down's syndrome.
Nature 267, 165 - 167 (1977)

28. DAHL, H., DEGRE, M.:
Human interferon and cell growth inhibition
I. Inhibitory effect of human interferon on the growth rate of cultured human cells.
Acta Path. microbiol. Scand. Sect. B 84, 285 - 292 (1976)

29. DAKE, H., DEGRE, M.:
Micro assay for mouse and human interferon
Acta Path. microbiol. Scand. Sect. B 84, 285 - 292(1975)

30. DANNECKER, G., TREUNER, J., BUCK, J., NIETHAMMER, D.:
Colony forming capacity of establisht cell lines after continuous and time limited exposure to ß - interferon compared to the induction to 2' - 5' - synthetase.
2nd Annual International Congress for Interferon Research
October 1981, San Francisco (1981)

31. The use of in vitro methods to predict tumor response to chemotherapy.
Br. J. Cancer 41, Suppl. IV, 195 - 198 (1980)

32. DORR, R.T., FRITZ, W.L.:
Cancer Chemotherapy Handbook
New York (1980)

33. DREWINKO, B., LOO, T.L., BROWN, B., GOTTLIEB, J.A., FREIREICH, E.J.:
Combination chemotherapy in vitro with adriamycin. Observation of additive, antagonistic and synergistic effects when used in two drug combinations on cultured human lymphoma cells.
Cancer Biochem. Biophys., 1, 187 - 195 (1976)

34. DREWINKO, B., ROPER, P.R., BARLOGIE, B.:
Patterns of cell survival following treatment with antitumor agents in vitro.
Br. J. Cancer, 15, 93 - 99 (1979)

35. DREWINKO, B., PATCHEN, M., LI-YING YANG, BARLOGIE,B.:
Differential killing efficacy of twenty antitumor drugs on proliferating and nonproliferating human tumor cells.
Cancer Research 41, 2328 - 2333 (1981)

36. EICHBERGER, S., MEYER, D.:
Antiproliferativer Effekt von IFN -α und IFN - ß bei menschlichen Tumorzellinien.
Inauguraldissertation, Tübingen (1982)

37. EIFE, R., HAHN, T., de TAVERA, M., SCHERTEL, F., HOLTMANN, H., EIFE, G., LEVIN, S.:
A comparison of the antiproliferative and antiviral activities of alpha, beta and gamma interferons: Description of a simple unified assay for comparing both effects simultaneously.
Im Druck (1981)

38. EINHORN, S.,STRANDER, H.:
Is interferon tissue specific? - Effect of human leukocyte and fibroblast interferons on the growth of lymphoblastoid and osteosarkoma cell lines.
J. Gen. Virol., 35, 573-577 (1976)

39. FOGH, J., WRIGHT, C.W., LOVELESS, J.D.:
Absence of Hela cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors.
J. Natl. Cancer Inst., 58, 209-214 (1977)

40. FOWLER, J.F.:
Conference summary, Comments and conclusions from experimental studies.
Br. J. Cancer, 41, Suppl. IV, 315-322 (1980)

41. FUCHSBERGER, N., HAJNICKA, V., BORECKY, L.:
Antiviral and cell-growth inhibitory activities of highly purified L cell interferon. An analysis of quantitative disproportions.
Acta Virol., 19, 59-61 (1975)

42. GISLER, R.H., LINDAHL, P., GRESSER, I.:
Effects of interferon on antibody synthesis in vitro.
J. Immun., 113, 438-444 (1974)

43. GREESER, I., BOURALI, C.:
Antitumor effects of interferon preparations in mice.
J. Nat. Cancer Instit., 45, 365 - 375 (1970)

44. GRESSER, I., BROUTY - BOYE, D., THOMAS, M.T., MACIEIRA - COELHO, A.:
Interferon and cell division. Inhibition of the multiplication of mouse leukemia $L_{1210}$ cell multiplication in vitro by interferon preparations.
Proc. Natl. Acad. Sci., 66, 1052 - 1058 (1970)

45. GRESSER, I., BROUTY - BOYE, D., THOMAS, M.T., MACIEIRÁ - COELHO, A.:
Interferon and cell division. II. Influence of various experimental conditions on the inhibition of $L_{1210}$ cell multiplication in vitro by interferon preparations.
J. Nat. Cancer Instit., 45, 1145 - 1153 (1970)

46. GRESSER, I., THOMAS, M.T., BROUTY - BOYE, D.:
Effect of interferon treatement of $L_{1210}$ cells in vitro on tumor and colony formation.
Nature 231, 20 - 21 (1971)

47. GRESSER, I.:
Antitumor effects of interferon.
Advanc. Cancer Res., 16, 97 (1972)

48. GRESSER, I., MAURY, C., BROUTY - BOYE, D.:
On the mechanism of the antitumor effect of interferon in mice.
Nature 239, 167 (1972)

49. GRESSER, I., BANDU, M.T., TOVEY, M., BODO, G., PAUCKER, K., STEWART II, W.E.:
Interferon and cell division VII. Inhibitory effect of highly purified interferon preparations on the multiplication of Leukemia $L_{1210}$ cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 7 - 10 (1973)

50. GRESSER, I., BANDU, M.T., BROUTY-BOYE, D.:
Interferon and cell division.IX. Interferon-resistent $L_{1210}$ cells; characteristics and origin.
J. Natl. Cancer Inst. 62, 553-559 (1974)

51. GRESSER, I.:
On the varied biologic effect of interferon.
Cellular Immunol. 34, 406-415 (1977)

52. GRESSER, I., MAURY, C., TOEY, M.:
Efficacy of combined interferon cyclophosphamide therapy after diagnosis of lymphoma in AKR mice.
Europ. J. Cancer 14, 97-99 (1978)

53. GUTTERMANN, J.U.:
Leukocyte interferon induced tumor regression in human breast cancer.
First annual congres for interferon research, Washington D.C. (1980)

54. HAMBURGER, A.W., SALMON, S.E.:
Primary bioassay of human tumor stem cells.
Science 197, 461-463 (1977)

55. HAMBURGER, A.W.:
Cloning of human tumor cells in soft agar.
TCA Manual, Vol. 5, No. 3, 1141-1145 (1979)

56. HAMBURGER, A.W., SALMON, S.E., ALBERTS, D.S.:
Direct cloning of human ovarian carcinoma cells in agar.
Cancer Research 38, 3438-3444 (1978)

57. HARTLEY-ASP, B.:
Differences in the sensitivity of cell survival assays due to methodological aspects, choice of cell type and rates of metabolic degradation.
Br. J. Cancer 41, Suppl. IV, 155 (1980)

58. HILFENHAUS, J., KARGES, H.E.:
Growth inhibition of human lymphoblastoid cells by interferon preparations, obtained from human leukocytes.
Z. Naturforsch. C. 29, 618-622 (1974)

59. HILFENHAUS, J., DAMM,H.,KARGES,H.E.,MANTHEY,K.F.:
Growth inhibition of human lymphoblastoid Daudi cells in vitro by interferon preparations.
Arch. Virol. 51, 87-97 (1976)

60. HILFENHAUS, J., DAMM, H., JOHANNSEN. R.:
Sensitivity of various human lymphoblastoid cells to the antiviral and anticellular activity of human leukocyte interferon.
Arch. Virol. 54, 271-277 (1977)

61. HILL. N.O.:
Human leukocyte interferon trials in cancer and leukemia.
J. Clinical Hemat. a. Onc. 11, No. 11 23-37 (1981)

62. ISAACS, A., LINDENMANN, J.:
Virus interference. I. The interferon
Proc. Royal Soc. B 147, 258-267 (1957)

63. ISAACS, A., WESTWOOD, M.A.:
Duration of protective action of interferon against infections with West Nile Virus.
Nature, 134, 1232-1233 (1959)

64. KNIGHT, E., Jr.:
Interferon: effect on the saturation density to which mouse cells will growth in vitro.
J. Cell. Biol. 56, 846-849 (1973)

65. KNIGHT, E., Jr.:
Interferon purification and initial characterisation from human diploid cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA.73, 520-523 (1976)

66. KNIGHT, E., Jr.:
Antiviral and cell growth inhibitory activities reside in the same glycoprotein of human fibroblast interferon.
Nature 262, 302-303 (1976)

67. KNIGHT, E., Jr.:
Human fibroblast interferon: Amino acid analysis and amino terminal amino acid sequence.
Science 207, 525-527 (1980)

68. KUWATA, T., FUSE, A., SUZUKI, N., MORINAGA, N.:
Comparison of the suppression of the cell and virus growth in the transformed human cells by leukocyte and fibroblast interferon.
J. gen. Virol. 43, 435-439 (1979)

69. LEA, D.E.:
Action of the radiation of living cells.
Cambridge University Press, London (1955)

70. LEVY, H.B., MERIGAN, T.C.:
Interferon and uninfected cells
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 53-55 (1966)

71. LINDAHL-MAGNUSSON, P.,LEARY,P.,GRESSER, I.:
Interferon and cell division. IV. Inhibitory effect of interferon on the multiplication of the mouse embryo and mouse kidney cells in primary cultures.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 1044-1050 (1971)

72. LINDAHL, P., LEARY, P., GRESSER, I.:
Enhacement by interferon of the specific cytotoxicity of senstized lymphocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci.USA 69, 721-725 (1972)

73. LINDAHL, P., LEARY, P., GRESSER, I.:
Enhacement by interferon of the expression of the surface antigens on murine leukemia $L_{1210}$ cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2785-2788 (1973)

74. LOCKART, R.Z., Jr.:
The necessity for cellular RNA and protein synthesis for viral inhibition from interferon.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 513-518 (1964)

75. LOCHART, R.Z., Jr.:
Criteria for acceptance of a viral inhibitor as an interferon and a general description of the biological properties of the known interferons.
in: Interferon and Interferon Inducers, pp.11-27
Amsterdam: North Holland Publ. Co. (1973)

76. LUDWIG, H., SCHERNTHANER, G., SWETLY, P.:
Interferon inhibits in vitro colony formation of myeloma stem cells.
Europ. J. of Cl. Inv. 10, ($W_2$), 24 (1980)

77. MARTIN, W.M.C., Mc NALLY, N.J.:
Cytotoxicity of adriamycin to tumor cells in vivo and in vitro.
Br. J. Cancer 42, 881-889 (1980)

78. Mc ALLISTER, J.:
A continous human cell line derived from rhabdomyosarkoma.
Cancer 24, 520-526 (1969)

79. MERIGAN, T.C.:
Prelimary observations on the effect of human leukocyte interferon in non Hodgkin's lymphoma.
N. England J. Med. 229, 1449-1453 (1978)

80. NAGATA, S., TAIRE, H.:
Synthesis in E. coli of a polypeptide with human leukocyte interferon activity.
Nature 284, 316-320 (1980)

81. PAUCKER, K., CANTELL, K., HENLE, W.:
Qauntitative studies on viral interference in suspended L-cells. III. Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells.
Virology 17, 324-334 (1962)

82. PFEFFER, L.M., MURPHY, J.S., TAMM, I.:
Interferon effects on the growth and division of human fibroblasts.
Exp. Cell Research 121, 111-120 (1979)

83. PFEFFER, L.M., WANG, E., LANDBERGER,F.K.,TAMM,I.:
Plasma membrane and cytoskelaton of interferon-treated human cells.
In: Report of the IInd International Workshop on Interferons. Rockefeller Univ. Press,N.Y. (1980)

84. REVEL, M., BASH, D., RUDDLE, F.H.:
Antibodies to a cell - surface component coded by human chromosome 21 inhibit action of interferon.
Nature 260, 139, (1976)

85. ROCKWELL, S.:
In vivo - in vitro tumor cell lines: Characteristics and limitations as modells for human cancer.
Br. J. Cancer 41, Suppl. IV, 118 - 122 (1980)

86. SALMON, S.E.:
Cloning of human tumor cells
New York (1980)

87. SALMON, S.E., ALBERTS, D.S., MEYSKENS, F.L., DURIE,S.M., SOEHNLEIN, B., MOON, T.E.:
Clinical correlations of in vitro drug sensivity.
Aus: SALMON, S.E., Cloning of human tumor stem cells 223 - 245, New York, (1980)

88. SCHATTNER, A., MERLIN, G., WALLACH, D., ROSENBERG,H., BINO, T., LEVIN, S., REVEL, M.:
Monitoring of interferon therapy by assay of(2' - 5') oligoisoadenylate synthetase in human periphal white blood cells.
J. Interferon Research 4, 587 - 595 (1981)

89. SCHULTZ, R.M., PAPAMATHEAKIS, J.D., CHIRIGOS, M.A.:
Interferon: An inducer of macrophage activation by polyanions.
Science 197, 674 - 676 (1977)

90. SENIK,A., GRESSER.I., MAURY,C., GIDLUND,M., ORN,A., WIGZELL,H.:
Enhacement by interferon of natural killer cell activity in mice.
Cell Immunol. 44, 186 - 200 (1979)

91. SHIBATA, H., TAYLOR-PAPDIMITRIOU, J.:
Effect of human lymphoblastoid interferon on cultured breast cancer cells.
in: The biology of the interferon system; Biomedical Press Elseier / Holland (1981)

92. SLATER, L.M., WETZEL, M.W., CESARIO, T.:
Combined interferon - antimetabolite therapy of murine $L_{1210}$ leukemia.
Cancer 48, 5-9 (1981)

93. STEEL, G.G., PECKHAM, M.J.:
Human tumor xenografts: A critical apptaisel.
Br. J. Cancer 41 Suppl. IV. 133-141 (1980)

94. STEWART II, W.E., GRESSER, I., TOVEY,M.G.:
Identification of the cell multiplication inhibitory factors in the interferon preparations as interferon.
Nature 262, 300-303 (1976)

95. STEWART II, W.E., LIN, L.S., WIRANOWSKA - STEWART,M.:
Antiviral and other activities of pure interferons and interferoids.
Proceedings of the IVth Int. Cong. Virology, Den Haag, Netherlands (1978)

96. STEWART II, W.E., LIN, L.S., WIRANOWSKA - STEWART,M.:
Antiviral and other activities of pure interferon and interferoids.
Proceedings of the IVth Int. Cong. Virology, Den Haag, Netherlands (1978)

97. STEWART II, W.E.:
Interferon Nomenclature Recommendations
I. Infectious Diseasas 142, No.4 643 (1980)

98. STRANDER,H., CANTELL,K., CARLSTRÖM,G.,JAKOBSSON,P.A.:
Clinical and laboratory investigations on man:Systemic administration of potent interferon to man.
J. Natl. Cancer inst. 51, 733 - 742 (1973)

99. STRANDER,H.:
Interferons: Anti - neoplastic drugs?
Blut, 35, 277 - 288 (1977)

100. STRANDER, H.:
Antitumor effects of interferon and its possible use as an antineoplastic agent in man.
Texas Rep. Biol. Med. 36, 429 - 435 (1977)

101. STRANDER, H., EINHORN, S.:
Effect of human leukocyte Interferon on the growth of human osteosarkoma cells in tissue culture.
Int. J. Cancer 19, 468 - 473 (1977)

102. STRANDER, H.:
Clinical trials conducted with interferon on tumor patients in europe.
aus: The biology of the interferon system
Elsevier, North Holland, Biomediacl Press 169,
387 - 391 (1981)

103. TAN, Y.H., TISCHFIELD, J., RUDDLE, F.H.:
The linkage of the genes for human interferon-induced antiviral protein and indophenol oxidase-B traits to chromosome g-21.
J. Exp. Med., 137, 317-330 (1973)

104. TAN, Y.H., CRAGAN, R.P., RUDDLE, F.M.:
Assignment of the genes for the human interferon system to chromosomes 2 and 5.
Genet. 13, 155-157 (1974)

105. TAN, Y.H., CRAGAN, R.P., RUDDLE, F.M.:
The somatic cell genetics of human interferon lici to chromosomes 2 and 5.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2251-2255 (1974)

106. TREUNER, J., DANNECKER, G., NIETHAMMER, D.:
Effect of interferon on the cell growth under experimental and clinical conditions.
16th workshop for pediatric research
Europ. J. Ped. 185, 133-138 (1980)

107. TREUNER, J., NIETHAMMER, D., DANNECKER, G.,JASKE,A. ALDENHOFF, P., KREMERS,B., NESSLER,G., BÖRNER,H.: Treatment of Nasopharingeal-carcinoma in children with fibroblast interferon. in Grundmann et. al. eds, Cancer Campaign Vol.5 309-317 Gustav Fischer Verlag Stuttgart, N.Y.(1981)

108. TREUNER, J. NIETHAMMER, D., BERTHOLD, F.,LAMPERT,F.: Comparative treatement of metastasis childhood neuroblastoma with human fibroblast interferon. Second annual international congress for interferon research. San Francisco, CA.,Oct. 21-23 (1981)

109. TREUNER, J., DANNECKER, G.: Interferon- Grundlagen und bisherige klinische Anwendung. Fortschritte der Medizin Nr. 21, 807-813 (1981)

110. TREUNER, J., DANNECKER, G., JOESTER, K.E., HETTINGER, A., NIETHAMMER, D.: Pharmacological aspects of clinical stage I/II trials with human beta interferon in children. J. Interferon Research 1, No.3 373-380 (1981)

111. TROTT, K.R.: Can tumor response be assessed from biopsy? Br. J. Cancer 41, Suppl. IV. 163-170 (1980)

112. TUMILOWICZ, J.J., NICOLS,W.W., CHOLON,J.J.,GREENE,A.E.: Definition of a continous human cell line derived from neuroblastoma Cancer Research 30, 2110-2118 (1970)

113. VALERIOTE, F.A., TOLEN, S.J.: Survival of hematopoietic and lymphoma colony - forming cells in vivo following the administration of a variety of alkylating agents. Cancer Research 32, 470 - 476 (1972)

114. VALLBRACHT, A., TREUNER, J., FLEHMING,B., JOESTER,K.E., NIETHAMMER, D.:
Interferon - neutralazing antibodies in a patient treated with fibroblast interferon.
Nature 289, 496 - 497 (1981)

115. WANATABE, Y., SOKAWA, Y.:
Effect of Interferon on the cell cycle of BALB/c3T3 cells
J.Gen. Virol. 41, 411 - 415 (1973)

116. WINKLER, K.:
Cooperative osteosarkoma study (COSS 80)
Meeting of the german society of pedriatic oncology.
Frankfurt (8.12.1979)

117. WIRANOWSKA - STEWART, M., STEWART II, W.E.:
The role of human chromosome 21 in sensitivity to interferon.
J. Gen. Virol. 37, 629 - 634 (1977)

118. WIRANOWSKA - STEWART, M., LIN, L.S., CHUDZIO, T., STEWART II, W.E.:
Contributions of carbohydrate moieties to the physical and biological properties of human leukocyte, lymphoblastoid and fibroblast interferons.
Abst. Ann. Meeting Amer. Soc. Microbiol. (1978)

Für die Überlassung der Arbeit und die Anleitung und Unterstützung bei ihrer Abfassung danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. J. Treuner.

Meinen Dank aussprechen möchte ich für sein persönliches Engagement bei der Einweisung in das Thema Herrn Dr. med. G. Dannecker.

Bei J. Buck, dessen inhaltliche und persönliche Anregung die Entwicklung dieser Arbeit wesentlich förderten und der mir einen Teil seiner Ergebnisse zum Vergleich überließ, möchte ich mich herzlich bedanken.

Lebenslauf

Manfred Dilger
geboren am 7.5. 1956 in Mahlstetten
als Sohn des Anselm Dilger und seiner
Ehefrau Katharina geb. Schweizer

1963-1967 Besuch der Grundschule
in Mahlstetten

1967-1976 Besuch des Albertus-Magnus-
Gymnasiums in Rottweil

1976 Abitur

1976-1977 Zivildienst als Rettungssanitäter
beim Roten Kreuz in Rotteil

1977 im Sommersemester Beginn des Medizinstudiums
an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

1979 Ärztliche Vorprüfung

Am 28.11.1980 Heirat mit Anita Dilger
geb. Müller in Rottweil

Am 26.8.1983 Geburt unserer Tochter Lena Katharina

Nach Ableistung des "Praktischen Jahres" an der
Universität Tübingen, bestehen des Staatsexamens
am 20. Oktober 1983.

Druck Köhler Tübingen